

**TOLPERIZON TÍPUSÚ CENTRÁLIS TÁMADÁSPONTÚ
IZOMLAZÍTÓK GYÓGYSZERHATÁSTANI ELEMZÉSE
PREKLINIKAI VIZSGÁLATOKBAN ÉS KUTATÁS MIGRÉN
PREKLINIKAI MODELLEZÉSÉRE**

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés



Dr. Farkas Sándor

**Gyógyszertudományok Doktori Iskola
Neurofarmakológia program**

Doktori Iskola vezetője:	Prof. Dr. Pintér Erika
Programvezető:	Prof. Dr. Pintér Erika
Témavezető:	Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

Pécs, 2016

Tartalom

1	1. Fejezet: Tolperizon típusú centrális támadáspontú izomlazítók gyógyszerhatástani vizsgálatai	3
1.1	Bevezetés	3
1.1.1	Általános célkitűzések	3
1.1.2	Konkrét célkitűzések	3
1.2	Módszerek	5
1.2.1	Hatékonyság és mellékhatások vizsgálata neurofarmakológiai módszerekkel egereken	5
1.2.2	Neurofiziológiai vizsgálatok öntudattalan macskák	6
1.2.3	Neurofiziológiai vizsgálatok öntudattalan patkányokon	7
1.2.4	Izolált félbevágott patkány gerincvelőn végzett in vitro vizsgálatok	8
1.2.5	Feszültség-függő csatornákra kifejtett hatások elemzése patch-clamp módszerrel	9
1.3	Eredmények	10
1.3.1	Neurofarmakológiai vizsgálatok egereken	10
1.3.2	Neurofiziológiai vizsgálatok öntudattalan macskák	11
1.3.3	Neurofiziológiai vizsgálatok öntudattalan patkányokon	14
1.3.4	Izolált félbevágott patkány gerincvelőn végzett in vitro vizsgálatok	16
1.3.5	Feszültség-függő csatornákra kifejtett hatások elemzése patch-clamp módszerrel	17
1.4	Következtetések összefoglalása	20
1.5	Hivatkozások	21
2	2. Fejezet: Migrén preklinikai modellezése	22
2.1	Bevezetés	22
2.2	Anyagok és módszerek	22
2.2.1	Gyógyszerkezelések és vivőanyagok	22
2.2.2	Fénykerülés teszt	23
2.2.3	Kraniális véráramlás kísérletek	23
2.2.4	A TNC és a TRG immunohisztokémiai vizsgálata	23
2.2.5	Termális hiperalgéria mérése a mancson hot-plate teszttel	23
2.2.6	Mechanikai allodynia mérése mancson von Frey szálakkal	23
2.2.7	Orofaciális fájdalomérzékenység mérése von Frey szálakkal	23
2.3	Eredmények	24
2.3.1	Fénykerülés teszt	24
2.3.2	Kraniális véráramlás teszt	24
2.3.3	c-Fos és nNOS hisztokémiai vizsgálatok	24
2.3.4	Termális hiperalgéria a mancson hot-plate teszttel mérve	25
2.3.5	Mechanikai allodynia mancson	25
2.3.6	Orofaciális fájdalomérzékenység	25
2.4	Következtetések összefoglalása	26
2.5	Hivatkozások	27
3	A pályázó közleményei	28
3.1	A disszertáció alapjául szolgáló közlemények	28
3.2	A pályázó további tudományos közleményei	28
4	Köszönetnyilvánítás	30

1 1. Fejezet: Tolperizon típusú centrális támadáspontú izomlazítók gyógyszerhatástani vizsgálatai

1.1 Bevezetés

1.1.1 Általános célkitűzések

A centrális támadáspontú izomlazító (CMR) gyógyszereket a klinikai gyakorlatban, különböző ortopédiai, reumatológiai vagy neurológiai betegségekben szenvedőknél, a rendellenesen megnövekedett izomtónus enyhítésére használják. Számos klinikailag hatékony gyógyszert alkalmaznak, azonban ezek hasznosságát számos tényező korlátozza.

A tolperizon (Mydeton) különösen relatív mellékhatásmentességével bizonyult hasznosnak. Hatékonyságát kettős vak placebo kontrollált klinikai vizsgálatok bizonyították *stroke* utáni spaszticitás (Stamenova és mtsai. 2005) és fájdalommal járó izomspazmusok (Pratzel és mtsai. 1996) esetén. Továbbá a tolperizon mentesnek bizonyult szedatív mellékhatásoktól egy kettősvak placebo kontrollált klinikai vizsgálat tanúsága szerint, melyben egy pszichomotoros teljesítményt vizsgáló tesztcsomagot alkalmaztak szubjektív értékeléseken kívül (Dulin és mtsai. 1998). Azonban a tolperizon gyorsan metabolizálódik, ami *first-pass* metabolizmus révén csökkenti biohasznosulását, valamint felezési ideje is rövid, ami rövid hatástartamot és mérsékelt hatékonyságot eredményez (Miskolczy és mtsai. 1987).

Nagy és kielégítetlen orvosi igény van nagyobb hatékonyságú és javított mellékhatásprofilú vázizom lazító gyógyszerekre. Ezért kutatási megközelítésünk alapja az volt, hogy a tolperizonból kiindulva, annak erősségeit megőrizve és gyengeségeit kijavítva olyan új gyógyszert fejlesszünk ki, mely

- 1) kevesebb mellékhatással rendelkezik, különös tekintettel központi idegrendszeri hatásokra;
- 2) kevésbé befolyásolja a normális, akaratlagos mozgásformákat;
- 3) kielégítő orális hatékonysággal és hatástartammal rendelkezik.

Ebből a célból olyan módszertani eszköztár kialakítását tűztük ki centrális izomlazítók jellemzésére, mely jól felméri a vizsgált vegyületek profiljának változásait (javulását vagy romlását). Továbbá vizsgálatokat végeztünk a tolperizon típusú izomlazítók hatásmechanizmusának tisztázására ugyancsak ennek a célkitűzésnek támogatására.

A felépített eszköztár segítségével kiválasztottunk egy új tolperizon típusú gyógyszerjelöltet (RGH-5002, szilperizon), mely kedvező tulajdonságokat mutatott mind a tolperizonnal, mind más izomlazító gyógyszerekkel összevetésben. A kiválasztás folyamata nem tartozik jelen disszertáció tárgykörébe. Ellenben ennek az új gyógyszerjelöltnek a jellemzése és összevetése tolperizon típusú és más izomlazító gyógyszerekkel a disszertáció fő témája.

1.1.2 Konkrét célkitűzések

1. Kiválasztani olyan egyszerű és gyors teszteket, melyek alkalmasak centrális izomlazítók hatékonyságának és várható mellékhatásaiak megbecslésére egereken.
2. Felmérni a GYKI-20039 indukált tremor teszt használhatóságát centrális izomlazítók hatékonyságának tesztelésére, beleértve az orális hatékonyság és hatástartam jellemzését is.
3. Felmérni annak a kiválasztott tesztcsomagnak a használhatóságát a kritikus terápiás indexek jellemzésére, mely a GYKI-20039 tremor tesztet alkalmazza a kívánt hatékonyságok mérésére és a lokomotor aktivitás, a rotarod, a thiopental alvásidő és az újonnan kifejlesztett súlyemelés tesztet alkalmazza a nemkívánatos mellékhatások – szedáció és motoros funkciókárosodások – jellemzésére.
4. Az új tolperizon típusú gyógyszerjelölt – a szilperizon – és a klinikai gyakorlatban használt izomlazító gyógyszerek terápiás indexeinek összehasonlító jellemzése egereken.

5. Kiválasztani egy olyan neurofiziológiai tesztet, mely különösen alkalmas centrális izomlazító gyógyszerek *in vivo* hatékonyságának és hatástartamának megbízható jellemzésére nem éber macskákon.
6. Jellemezni a szilperizon farmakodinámiás hatékonyságát a kiválasztott neurofiziológiai teszten, összevetve más centrális izomlazítókkal és különösen tolperizon típusú izomlazítókkal, tekintettel az *in vivo* hatékonyságra, hatástartamra, orális (helyett intraduodenális) hatáserősségre vagy funkcionális biohasznosulásra.
7. Összehasonlítani centrális izomlazító gyógyszerek hatékonyságát spinális és ép neuraxisú macskákon, mely összehasonlítás hozzájárul az elsődleges hatás helyére vonatkozó következtetések levonásához.
8. Vizsgálni különböző centrális izomlazítók hatásmintázatának hasonlóságait és különbözőségeit a mellső- és hátsógyöki reflexpotenciálokra kifejtett hatások tekintetében (macskákon), és következtetéseket levonni arra, hogy ezen információk hogyan használhatók (új) gyógyszerek hatásmódjának jelzésére.
9. Összehasonlítani a tolperizon és a szilperizon hatásait a flexorreflexre, a térdreflexre, annak reticulospinális befolyásolására és a decerebrációs rigiditásra.
10. Megvizsgálni, hogy a tolperizon típusú izomlazítók reflexgátló hatása izolált gerincvelő preparátumon *in vitro* is megjelenik-e.
11. Összehasonlítani tolperizon típusú vegyületek farmakológiai profilját a szegmentális reflex aktivitásra (annak különböző komponenseire) kifejtett hatások tekintetében és kiegészíteni ezt az összehasonlítást a lidokain vizsgálatával is.
12. Összehasonlítani a szilperizon, tolperizon és lidokain farmakológiai profilját az elsődleges afferensek excitabilitására, a motoneuronok excitabilitására és a monoszinaptikus ingerlődésre kifejtett hatások tekintetében *in vivo*.
13. Összehasonlítani a szilperizon, tolperizon és lidokain farmakológiai profilját az elsődleges afferensek excitabilitására és a motoneuronok EPSP-jére kifejtett hatások tekintetében *in vitro*.
14. Mivel az előző vizsgálatok arra utaltak, hogy a szilperizon nagyobb hatást fejtett ki az EPSP-re, mint az az elsődleges afferensek excitabilitásának gátlása alapján várható lett volna, ezért elemeztünk olyan lehetséges hatásokat, melyek az EPSP nagyságát befolyásolhatták volna, akár preszinaptikus gátlással GABA-B receptorokon keresztül, akár posztzinaptikusan a glutamáterg serkentő transzmisszió gátlása révén (AMPA vagy NMDA típusú glutamát receptorok antagonizálása révén) *in vitro*.
15. A molekuláris hatásmechanizmus elemzésére vizsgáltuk azt is, hogy a szilperizon befolyásol-e GABA és/vagy glicin receptor mediált gátló pályákat, mint a szomszédos előre-ható és a visszakanyarodó (Renshaw) gátlása a monoszinaptikusan kiváltott motoneuron tüzelésnek *in vivo*.
16. A szilperizon és tolperizon „membrán stabilizáló” hatásainak specifikálására vizsgáltuk hatásukat érződúc (DRG) sejtek feszültség-függő Na⁺, Ca²⁺ és késői egyenirányító K⁺ áramaira egészsejt patch-clamp technikával és a hatékony koncentrációkat összevetettük az *in vitro* gerincvelői reflex kísérletekben detektált hatékony koncentrációkkal.
17. Ezen patch-clamp kísérletek során néhány kísérletet végeztünk a szilperizon által befolyásolt Na⁺ és Ca²⁺ csatornák altípusainak jellemzésére is.

1.2 Módszerek

1.2.1 Hatékonyság és mellékhatások vizsgálata neurofarmakológiai módszerekkel egereken

1.2.1.1 GYKI 20039-indukálta tremor teszt

Hím CFLP egereket (19–21 g) kezeltünk intraperitoneálisan a GYKI 20039 jelű tremorogén vegyülettel. Ezután az állatokat (2 összeillesztett tejföls pohárból készített) könnyű műanyag kamrába helyeztük, melyet izometriás erőmérőre függesztettünk. Az erőmérő a kamra tremor által keltett rezgéseit feszültségjellé konvertálta, melyet analog integrátorba vezettünk a tremor mértékének kvantifikálására.

1.2.1.2 Morfin-indukálta Straub farok teszt

Novack (1982) módszerét használtuk kis módosítással. A tesztvegyülettel való kezelést követően 5 perccel (baklofen esetén 15 perccel), hím OF-1 egereket (19–21 g) injekcióztunk morfinnal (60 mg/kg) szubkután (N=10 dózisszintenként). A morfin adását követően 15 perccel vizsgáltuk a Straub-farok jelenség meglétét vagy hiányát, melyet akkor tekintettünk pozitívnak, ha az egér faroktartása a vízszinteshez képest 45°-nál meredekebb volt. ID₅₀ értékeket (50 %-os gátló dózisokat) probit analízissel számoltunk.

1.2.1.3 Rotarod teszt

A kísérleteket 20–25 g súlyú hím CFLP egereken végeztük. A kísérlet előtti napon az állatokat előtréningnek vetettük alá, hogy képesek legyenek a 25 mm átmérőjű és 15/perc forgássebességű forgórúdon 120 mp-ig fennmaradni. Általában két vagy három gyakorlat elégséges volt, hogy a feladatot megtanulják. A kísérletbe csak azokat az állatokat vontuk be, melyek a következő nap reggelén is sikeresen hajtották végre a feladatot. A tesztvegyületeket 20 perccel (baklofen esetében 30 perccel) a tesztgyakorlat megkezdése előtt adtuk intraperitoneálisan és vizsgáltuk az állatok (N=10-12 dózisonként) képességét a tesztgyakorlat végrehajtására. ID₅₀ értékeket probit analízissel számoltunk.

1.2.1.4 Mozgás-aktivitás

A kísérleteket 20–25 g súlyú hím OF-1 egerek 12-es elemszámú csoportjain végeztük. Három azonos felépítésű Animex típusú (elektromágneses érzékelőkkel működő) 40x25 cm² alapterületű motiméter ketrecet használtunk. Egyszerre 3 állatot helyeztünk egy ketrecbe, melyeknek együttes összaktivitását mértük. Minden vizsgált vegyületet 6-8 dóziscsoporton teszteltünk. Minden kísérletben egy vehikulum-kezelt kontroll állatcsoportot vizsgáltunk párhuzamosan két kezelt csoporttal, végül azonban a kontroll csoportok eredményeit összevontuk. A lokomotor aktivitás gátlását az összevont kontroll csoporthoz viszonyított %-ban fejeztük ki, ID₅₀ értékeket a logaritmikus dózis-hatás görbékre fektetett lineáris regresszióval határoztuk meg.

1.2.1.5 Súlyemelés teszt

A kísérleteket 19-21 g súlyú hím OF-1 egereken végeztük. A teszteléshez egy 45 g súlyú egér-súlyzót alkalmaztunk, melynek volt egy 15 cm hosszú 6 mm külső átmérőjű függőleges nyele, melyet ragtapasszal (Leucoplast) borítottunk. A kísérletező az állatot a farkánál fogva fejfelé tartotta úgy hogy az mind a négy végtagjával bele tudjon kapaszkodni a súlyzó nyelébe. Ekkor az állatot (a súlyzóval együtt) farkánál fogva lassan felemelte. A súlyzó súlya közel volt ahhoz a maximális súlyhoz, melyet minden kezeletlen állat még fel tud emelni és legalább 3 mp-ig a levegőben tartani (tesztgyakorlat). A tesztvegyület beadása után 20 perccel (baklofen esetében 30 perccel) vizsgáltuk az állatokat (N=10 dózisszintenként), hogy képesek-e végrehajtani a tesztgyakorlatot. ID₅₀ értékeket probit analízissel számoltunk. A kontroll és kezelt csoportok közötti statisztikai összehasonlítást Fischer exact teszttel végeztük.

1.2.1.6 Thiopental alvásidő

A tesztvegyület intraperitoneális adása után 15 perccel kezeltünk hím CFLP egereket intravénásan thiopentallal (30 mg/kg). A helyreállító („righting”) reflex eltűnése és visszatérése közötti időt mértük. Az állatokat a thiopental beadása után 30 percig figyeltük, és ha nem volt visszatérés, akkor 30 percet vettünk figyelembe a számolásnál. Minden nap vizsgáltunk egy egyidejű sóoldat (és thiopental) kezelt kontroll csoportot is. Statisztikai analízisre Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk, melyet követően páros összehasonlításokat Mann-Whitney U-tesztel végeztünk.

1.2.2 Neurofiziológiai vizsgálatok öntudattalan macskák

1.2.2.1 Flexorreflex mérése ép macskák

A kísérleteket mindkét nemhez tartozó 2.2-4.5 kg súlyú kloralózzal altatott (75 mg/kg i.p. + 4 mg/kg/h folyamatos i.v. infúzió) ép macskák végeztük. Öt négyszögimpulzusból (20 V, 4 ms, 0.4 Hz) álló elektromos inger sorozatokat alkalmaztunk 30 mp-enként a plantáris idegek közelébe szúrt elektródpáron keresztül. Az EMG-s reflexválaszokat az azonos oldali m. tibialis anteriorból vezettük el koncentrikus tűelektróda segítségével és egy analóg feldolgozó rendszer segítségével elektronikusan integráltuk. Gyógyszeradagolást csak legalább 30 perces stabil reflexaktivitás után végeztünk.

1.2.2.2 Flexorreflex mérése spinális macskák

A kísérleteket 2.1-4.1 kg súlyú C1 szinten gerincvelőátmetszett („spinális”) macskák végeztük. Éteres altatás mellett a szokásos kísérleti sebészeti procedúrát és mindkét carotis lekötését követően gépi lélegeztetést kezdtünk egy Starling pumpával. Az atlanto-occipitális hárttyát feltártuk, bemetsztük és a gerincvelőt lidokainnal infiltráltuk, majd átmetsztük C1 szinten. Ezután egy a foramen magnumon keresztül bevezetett rúddal roncoltuk az agytörzset. A sebészeti beavatkozás végeztével az éter belélegeztetést megszüntettük és a flexor reflexet az ép állatok vizsgálatánál (fentebb) leírt módon végeztük. Gyógyszeradagolást csak legalább 2 órával az altatás felfüggesztése után és csak stabil reflexaktivitás mellett végeztünk.

1.2.2.3 Patellareflex mérése macskák

A kísérleteket mindkét nemhez tartozó 2.3-3.8 kg súlyú kloralózzal altatott (100 mg/kg i.p.) ép macskák végeztük. A szokásos kísérleti sebészeti procedúrát követően az állatot hanyattfekvő pozícióban helyeztük el. Az állat jobb hátsó végtagját enyhén rögzítettük úgy a combcsont függőlegesen, a lábszár vízszintesen helyezkedett el. A térdhajlat alulról egy vízszintes keresztirányú rúddal volt alátámasztva, míg a bokatájék egy rugón keresztül lett felfüggesztve. A patella reflexet 10 másodpercenként teszteltük egy elektromágnessel vezérelt kalapács segítségével. A bokához egy fonal és csiga-áttét segítségével elektronikus izometriás erőmérőt csatlakoztattunk. A fonal feszülését, illetve ennek mérése révén a térdreflex válaszokat egy hőíróscillográfias regisztrálón regisztráltuk.

1.2.2.4 A patellareflex reticulospinális befolyásolásának vizsgálata

A kísérleteket mindkét nemhez tartozó 2.5-4.1 kg súlyú macskák végeztük vagy kloralóz (100 mg/kg i.p.; 8 eset) vagy uretán (500-550 mg/kg i.p.; 4 eset) altatás mellett. A szokásos kísérleti sebészeti procedúrát követően a hason fekvő állat fejét sztereotaxiás készülékben rögzítettük. Az egyik combcsontot hegyes csavarokkal függőleges helyzetben rögzítettük. A lábszár vízszintes helyzetben függeszkedett, melyet egy a bokához erősített izometriás erőmérő biztosított. A patella reflexet 5 másodpercenként váltottuk ki és a fennebb leírt módon regisztráltuk. A koponyába fúrt lukakon keresztül koncentrikus ingerlő elektródákat (Rhodes NEX-100) süllyesztettünk a hídi facilitáló és a nyúltvelői gátló területekbe a reflexméréssel azonos oldalon, melyeken keresztül a két befolyásoló területet 5 percenként váltakozva ingereltük 40 mp-ig.

1.2.2.5 Tibialis ideg-ingerléssel kiváltott gerincvelői gyöki potenciálok macskák

A kísérleteket 2.5-4.2 kg súlyú macskákra végeztük. Éteres altatás mellett elvégeztük a szokásos kísérleti sebészeti procedúrát. A fent leírt módon végzett C1 spinalizálás az altatást felfüggesztettük. Hátsó laminectomiát hajtottunk végre az L₄₋₇-csigolyákon. Az L₆, L₇ és S₁ mellsőgyököket bal oldalon átmetsztük. A bal oldali tibialis ideget ingereltük és a mellsőgyöki reflexeket (VRR; L₇, S₁), valamint a hátsógyöki potenciált és reflexet (DRP and DRR; L₆) regisztráltuk bipoláris Ag-AgCl hurok elektródákkal. Az állatok maghőmérsékletét és a gerincvelőt fedő olajkád hőmérsékletét 37±0.2 °C-on illetve 36.5±0.2 °C-on tartottuk. A végkilégzési CO₂ koncentrációt 4%-on tartottuk gépi lélegeztetéssel. A különböző reflex komponenseket egy analóg integrációs feldolgozórendszerrel regisztráltuk.

1.2.2.6 Interkollikuláris decerebrációs rigiditás macskák

A kísérleteket 2.5-5 kg súlyú macskákra végeztük. Éteres altatás és gépi lélegeztetés mellett a szokásos kísérleti sebészeti procedúrát és mindkét carotis lekötését követően az állatokat sztereotaxiás készülékben rögzítettük. A koponya megfelelő részeinek eltávolítása után az agytörzset interkollikuláris szinten egy thermokauterrel átmetsztük és az éter belélegeztetést felfüggesztettük. Gyógyszerkísérletet csak stabil rigiditást mutató állatokon végeztünk. Egy elektromagnetikusan vezérelt kalapács koppintott a patellaínra 10 mp-enként. A quadriceps femoris izomból, és a kísérletek többségében a m. triceps brachii-ből is, elektromiográfiás regisztrálást végeztünk koncentrikus tűelektródával. Mind a patella reflexet, mind a folyamatos EMG aktivitást az említett izomból analóg módon integráltuk és az integrált aktivitásokat regisztráltuk.

1.2.3 Neurofiziológiai vizsgálatok öntudatlan patkányokon

1.2.3.1 Intercolliculáris decerebrációs rigiditás patkányokon

Éteres altatás és trachea kanülözést követő gépi lélegeztetés mellett mindkét carotis communist elkötöttük. Az agytörzset intercolliculáris szinten átmetsztük. Az átmetszést követően az altatást és gépi lélegeztetést megszüntettük és az állatokat végbélhőmérséklet-kontrollált infravörös lámpával 37°C-ra melegítettük. Gyógyszervizsgálatot stabil rigiditást mutató állatokon végeztünk. Az állatokat hanyatt fektettük egy patkányműtőasztalra. Az egyik gastrocnemius izomból végeztünk EMG regisztrálást és az EMG tüske-frekvenciáját regisztráltuk. Gyógyszeradagolást csak az EMG aktivitás stabilizálódása, és minimum 30 perccel az altatás felfüggesztése után végeztünk.

1.2.3.2 In vivo kísérletek altatott spinális állatokon.

1.2.3.2.1 Standard sebészeti procedúrák

A patkányokat kloralóz (25 mg/kg, i.p.) és uretán (1 g/kg, i.p.) keverékével altattuk. A vérnyomást a carotisba helyezett kanülön keresztül monitoroztuk. A femorális vénát is kanülöztük intravénás gyógyszeradásokhoz. Az állatokat gépileg lélegeztettük egy a tracheába helyezett kanülön keresztül a kísérlet teljes tartama alatt. A gerincvelőt C1 szinten átmetsztük. Az állatokat sztereotaxiás készülékben rögzítettük és az L₁-L₆ csigolyákon hátsó laminectomiát hajtottunk végre. Medencét formáltunk a hát bőréből, melyet meleg paraffin olajjal töltöttünk fel. Az állat és az olajmedence hőmérsékletét 36±0.2 °C-ra szabályoztuk.

1.2.3.2.2 Mellsőgyöki reflex vizsgálata

Az L₄ szegmentumban és alatta mindkét oldali mellső- és hátsógyököket átvágtuk, az L₅ hátsó- és mellsőgyököket izoláltuk és egy azonos oldali párost bipoláris ezüst hurok elektródákra helyeztünk. A hátsógyököt egyes impulzusokkal (supramaximális feszültség; 0.05 ms impulzusszélesség, 10/perc frekvencia) ingereltük. A mellsőgyöki potenciált egy differenciálerősítővel erősítettük és számítógépes adatrögzítőrendszerrel jelenítettük meg, illetve elemeztük.

1.2.3.2.3 Neuronális excitabilitási teszt

A motoneuronok sejttestek és elsődleges afferensek ingerelhetőségét mértük. Egy a hegye kivételével lakk-szigetelt wolfrám mikroelektródát süllyesztettünk a gerincvelőbe motoneuronok

területére és ezen keresztül negatív ingerlő impulzusokat alkalmaztunk (ingererősség: 0.2-0.5 mA; impulzusszélesség: 0.05 ms; frekvencia: 10/perc). A motoneuronok direkt ingerlése által kiváltott (MN, első tüske), és a monoszinaptikusan kiváltott (MS, második tüske) összetett akciós potenciált regisztráltuk az L₅ mellsőgyökről. Az antidrómosan kiváltott akciós potenciált, mely az elsődleges afferensek (PAF) excitabilitását tükrözi, az L₅ hátsőgyökről regisztráltuk.

1.2.3.2.4 Előreható gátlás vizsgálata

A mellsőgyöki reflexet vizsgáltuk a fentebb leírt módon. Az L₄ hátsőgyököt is bipoláris ezüst hurok elektródára helyeztük, hogy rajta keresztül kondicionáló impulzusokat alkalmazzunk különböző intervallumokkal az L₅ hátsőgyökre alkalmazott tesztimpulzus előtt. Az ingerlést ciklusokba szerveztük úgy, hogy 3 kondicionálás nélküli tesztelést követett 9 kondicionált tesztelés 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 és 1280 ms-os kondicionálás – teszt (C-T) intervallummal. Az integrált monoszinaptikus reflexet (MSR) értékeltük és a válaszokat a 3 kondicionálatlan válasz átlagához normalizáltuk. A végső értékelésben 5 ciklus eredményeit átlagoltuk a tesztvegyület beadása előtt és a vegyület beadása után akkor, amikor a tesztvegyület maximálisan csökkentette az MSR-t.

1.2.3.2.5 Visszakanyarodó (Renshaw) gátlás vizsgálata

Az L₅ mellsőgyököt két gyököcskére osztottuk. Az egyiket ingerlő elektródára helyeztük, hogy kondicionáló impulzusokat alkalmazzunk különböző intervallumokkal az L₅ hátsőgyökre alkalmazott tesztimpulzus előtt. A mellsőgyöki reflexet a másik gyököcskéről regisztráltuk. Az ingerlést ciklusokba szerveztük úgy, hogy 3 kondicionálás nélküli tesztelést követettek a kondicionált tesztelések 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ms-os C-T intervallumokkal. Az integrált MSR-t értékeltük az előreható gátlásnál leírt módon.

1.2.3.2.6 Afferens idegvezetés vizsgálata

A standard sebészeti procedúrán kívül a n. ischiadicus-t is feltártuk a térdhajlati régióban és ingerlő elektródára helyeztük. A hát és a comb bőréből közös medencét formáltunk és meleg paraffin olajjal feltöltöttük. A n. ischiadicus-t ingereltük az A rostokra maximális impulzusokkal (szélesség: 0.5 ms; frekvencia: 10/perc). Az L₅ hátsőgyököt a gerincvelő belépési pontnál átvágtuk, bipoláris ezüst elektródára helyeztük és az afferens rostok beérkező akciós potenciáljának monofázisos regisztrálása céljából a két pólus között elroncsoltuk.

1.2.4 Izolált félbevágott patkány gerincvelőn végzett in vitro vizsgálatok

1.2.4.1 Gerincvelői gyöki potenciálok (in vitro)

6-napos újszülött 13-16 g súlyú hím patkány békákat altattunk el éterrel, majd jégörleményre helyeztük a gerincvelő lehűtése céljából addig, amíg légzésük leállt. Ekkor a gerincvelőt eltávolítottuk és félbevágtuk. A félbevágott gerincvelőt regisztráló kamrába helyeztük és mesterséges cerebrospinalis folyadékkal (ACSF) 10 ml/perc sebességgel perfundáltuk. Egy üveg szívóelektródot alkalmaztunk az L₅ hátsőgyök ingerlésére. Azoknál a kísérleteknél, ahol az afferens rostoknak a gerincvelőt elérő összetett akciós potenciálját vizsgáltuk, egy szívóelektródot helyeztünk az L₄ hátsőgyökre is a gerincvelőbe érkező afferens rost potenciál (AFP) regisztrálására. A hátsőgyök ingerléssel kiváltott mellsőgyöki potenciált (DR-VRP) az L₅ mellsőgyökről regisztráltuk szorosan illeszkedő szívóelektróddal.

1.2.4.2 Gerincvelő „grease-gap” módszer (in vitro)

Félbevágott gerincvelőket nyertünk 6-napos patkányokból. Körülbelül 2 mm vastag harántirányú szeleteket készítettünk készítettünk ollóval úgy, hogy a szeletek az L₅-ös mellsőgyökkel való összeköttetését megtartották, míg a hátsőgyököket levágtuk. Ezután a szeleteket két-térfeles regisztráló kamrába helyeztük, úgy hogy a gerincvelőszelet az egyik térfélbe került, míg a mellsőgyök a másikba nyúlt át. A két térfélet egy plexi zsalu választotta ketté, úgy hogy szilikonszírral nagyellenállású szigetelést értünk el a két térfél között. A két térfélet egymástól függetlenül perfundáltuk 0.1 µM tetrodotoxin tartalmú ACSF-vel (TTX-ACSF) 2 ml/perc sebességgel. A két térfél közti DC potenciált Ag-AgCl elektródokkal folyamatosan regisztráltuk.

Depolarizációkat váltottunk ki 80 μ M NMDA vagy 40 μ M AMPA (glutamat receptor agonisták) ismételt egy percig tartó perfúziós adagolásával. Az agonista adásokat 30 perces időközönként ismételtük. A kontroll válaszok stabilizálódása után a tesztvegyületet hozzáadtuk a perfúziós oldathoz és az agonista adásokat tovább ismételtük.

1.2.5 Feszültség-függő csatornákra kifejtett hatások elemzése patch-clamp módszerrel

Tolperizon típusú izomlazítók és lidokain hatásait vizsgáltuk feszültség-függő nátrium-, kalcium- és késői egyenirányító kálium áramokra.

1.2.5.1 Érzőidegsejtek preparálása

Patkány hátsógyöki dúcból (DRG) akutan disszociált idegsejteket nyertünk, majd poli-D-lizinnel bevont steril fedőlemezekre oltottuk őket és szérummal kiegészített tenyésztőoldatban (DMEM) tartottuk őket egy éjszakán át.

1.2.5.2 Egészsejt patch-clamp regisztrálás és elemzés

Az idegsejteket tartalmazó fedőlemezt inverz mikroszkóp tárgyasztalára épített regisztráló kamrába helyeztük és extracelluláris oldattal (ES) perfundáltuk folyamatosan szobahőmérsékleten. Patch elektródokat intracelluláris oldattal (IS) töltöttünk fel, kiválasztott DRG sejthez csatlakoztatunk és egész-sejt membrán áramokat mértünk.

A nátrium áram mérésekhez használt ES összetétele (mM-ban): NaCl 140, KCl 5, CaCl_2 2, Hepes 5, HEPES-Na 5, glucose 10, saccharose 10, pH = 7.35. Egy második kísérletsorozatban a túl nagy mért áramok csökkentése végett egy módosított (optimalizált) ES-t használtunk a következő összetétellel (mM-ban): NaCl 70, choline chloride 70, KCl 5, CaCl_2 2, MgCl_2 2, HEPES 5, HEPES-Na 5, CdCl_2 0.01, glucose 20; pH=7.35. A nátrium áram mérésekhez használt IS összetétele (mM-ban): CsF 130, NaCl 15, tetraethylammonium chloride (TEA-Cl) 10, CaCl_2 0.1, MgCl_2 2, ATP- Na_2 2, HEPES 10, EGTA 1; pH=7.25.

A kalcium áram mérésekhez használt ES összetétele (mM-ban): choline chloride 143, CaCl_2 5, MgCl_2 1, HEPES 10, glucose 20; pH=7.3. A kalcium áram mérésekhez használt IS összetétele (mM-ban): CsCl 110, MgCl_2 4.5, HEPES 9, EGTA 9, ATP- Na_2 4. Mivel a kezdeti méréseknél egy inherens csökkenést („rundown”) figyeltünk meg, a későbbi méréseknél módosított („anti-rundown”) IS-t alkalmaztunk, mely egy nukleotid regeneráló rendszert és GTP-t is tartalmazott és megelőzte a rundown-t (Forscher and Oxford 1985). A módosított IS összetétele (mM-ban): CsCl 110, MgCl_2 4.5, HEPES 9, EGTA 9, ATP- Na_2 4, GTP 0.3, creatine phosphate (CP) 14, creatine phosphokinase (CPK) 50 U/ml.

A kálium áram mérésekhez használt ES összetétele (mM-ban): choline chloride 140, KCl 5, CaCl_2 2, MgCl_2 1, CdCl_2 0.1, HEPES 10, glucose 20. A kálium áram mérésekhez használt IS összetétele (mM-ban): KCl 145, MgCl_2 1, HEPES 10, EGTA 10.

A membránáramokat Axoclamp 200A erősítővel és pClamp 6.0-8.0 szoftverrel regisztráltuk és értékeltük. Eltekintve az aktiváció/inaktiváció feszültségfüggésére irányuló vagy egyéb komplex feszültség protokolloktól, a nátrium áramokat rutinszerűen különböző tartó feszültségekről („holding potentials”) 10 mp-ként alkalmazott 0 mV-ra való (8 ms tartamú) feszültség-lépcsőkkel vizsgáltunk.

Kalcium és kálium áramokat rutinszerűen 20 ms, illetve 100 ms hosszúságú depolarizáló feszültség-lépcsőkkel vizsgáltunk -80 mV tartó potenciálról 0 mV-ra, kivéve ha mást jelzünk.

A tesztanyagokat ES-ben oldottuk és gyors oldatcserés rendszeren keresztül adagoltuk a vizsgált sejtre.

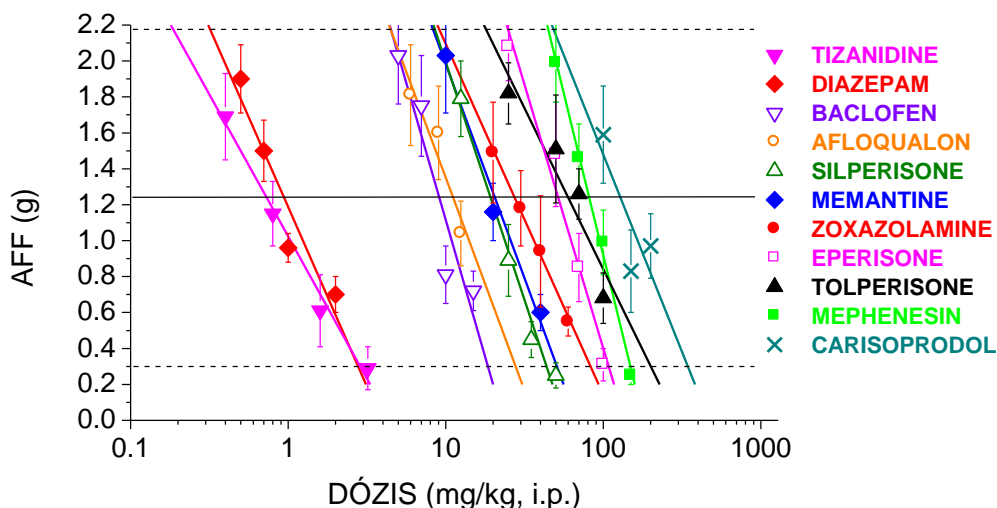
Koncentráció-gátlás összefüggést határoztunk meg tesztanyagonként és csatorna típusonként 4-10 sejten emelkedő koncentráció sorokat alkalmazva. A százalékos gátlást (átlag \pm S.E.M.) számoltunk minden koncentrációra és az IC_{50} -et szigmoidális görbe illesztéssel határoztuk meg.

1.3 Eredmények

1.3.1 Neurofarmakológiai vizsgálatok egereken

1.3.1.1 GYKI 20039-indukálta tremor teszt

Különböző izomlazítók dózis-hatás összefüggéseit összegezzük az 1. ábrán intraperitoneális adagolást követően.



1. ábra Különböző izomlazítók dózis-hatás összefüggései (n=10/csoport) GYKI 20039 (10 mg/kg i.p.)-indukálta tremor gátlása alapján. Mindegyik izomlazító dózis-függően gátolta a tremor. A felső és alsó vízszintes szaggatott vonal jelzi a tremorogen kezelt és kezeletlen kontroll csoportok tremor erősség (AFF) értékeit; a folytonos vonal mutatja az 50%-os gátlás szintjét.

Szájon át adva az összes vizsgált tolperizon típusú izomlazító gyors hatáskezdetet mutatott, 5 percen belül maximális hatást elérve. A szilperizon kétszer hatékonyabb volt, mint a többiek. Hatástartam tekintetében a következőképpen voltak rangsorolhatók (a legrövidebbtől leghosszabbikig): tolperizon < eperizon < lanperizon < szilperizon.

1.3.1.2 Straub tail, rotarod, locomotor and weight-lifting tests and therapeutic indices

Az eredményeket az 1. táblázatban összegezzük.

1. táblázat. Az éber egereken nyert eredmények összefoglalása.

	ID ₅₀ értékek (mg/kg, i.p.)					Ratios (Therapeutic indices)					
	Izomlazító hatások		Mellékhatások			ID ₅₀ mellékhatás/ID ₅₀ izomlazító hatás					
	TR	ST	RR	LO	WL	RR/TR	LO/TR	WL/TR	RR/ST	LO/ST	WL/ST
Szilperizon	19.3	21.8	36.9	64.0	44.2	1.91	3.32	2.29	1.69	2.94	2.03
Tolperizon	60.0	63	116	31.1	90.9	1.93	0.52	1.52	1.84	0.49	1.44
Eperizon	51.8	63.6	72.1	55.7	107	1.39	1.08	2.07	1.13	0.88	1.68
Tizanidin	0.73	1.4	1.2	0.10	2.8	1.64	0.14	3.84	0.86	0.07	2.00
Baklofen	9.1	2.8	7.9	3.1	8.2	0.87	0.34	0.90	2.82	1.11	2.93
Mefenezin	81.5	121	145	120	255	1.78	1.47	3.13	1.20	0.99	2.11
Zoxazolamin	27.4	32.2	50.1	60.5	43.7	1.83	2.21	1.59	1.56	1.88	1.36
Diazepam	0.94	1.0	0.6	3.1	0.8	0.64	3.30	0.85	0.60	3.10	0.80
Afloqualon	11.1	7.8	11.4	10.5	12.6	1.03	0.95	1.14	1.46	1.35	1.62
Carisoprodol	128.8	71.2	130	156	107	1.01	1.21	0.83	1.83	2.18	1.50
Memantin	20.5	34.9	23	>100	29	1.12	>4.90	1.41	0.66	>2.90	0.83

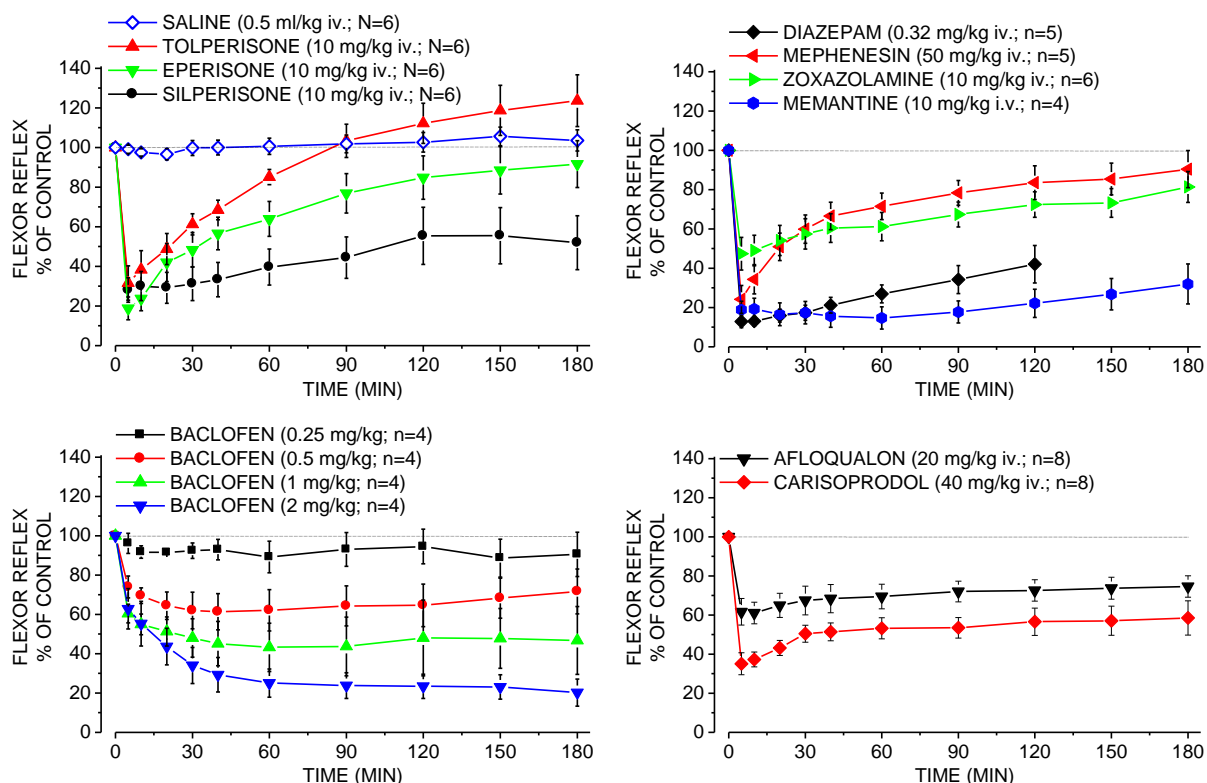
TR: tremor; ST Straub-farok; RR: rotarod; LO: mozgásaktivitás; WL: súlyemelés teszt

1.5-nél kisebb (azaz 1-től nem jelentősen különböző) terápiás indexeket jelöltük satírozással.

1.3.2 Neurofiziológiai vizsgálatok öntudattalan macskákön

1.3.2.1 Flexorreflex mérése macskákön

Különbözö izomlazító vegyületek hatásának időbeli lefolyását mutatja a 2. ábra.



2. ábra A szilperizon és különbözö izomlazító gyógyszerek idő-hatás görbéi a flexorreflex testben altatott ép neuraxisú macskákön vénás beadást követően. Átlag±S.E.M. értékeket ábrázoltunk. Megfigyelhető, hogy a szilperizon hatásából való visszatérés sebessége sokkal lassabb, mint a tolperizon és az eperizon esetében.

A különbözö vizsgált izomlazítók *in vivo* hatékonyságait (hatékony dózisait) foglalja össze a 2. táblázat.

2. táblázat. Izomlazítók *in vivo* hatékonyságai (intravénás ID₅₀-ei) a flexorreflex testben ép és spinális macskákön.

Gyógyszerek	ID ₅₀ (mg/kg) macskán	
	ép	spinális
Szilperizon	5.8	5.7
Tolperizon	4.3	5.1
Eperizon	3.5	6.7
Memantin	6.8	15.8
Mephenezin	21.0	31.0
Zoxazolamin	9.6	16.0
Baklofen	0.83	0.67
Diazepam	0.045	0.22
Carisoprodol	13.5	>>20

1.3.2.2 Patellareflex macskákön

A tolperizon (10 mg/kg, i.v.) enyhe (átlagosan 15%) és rövid ideig tartó csökkenést eredményezett a patellareflexben. A szilperizon (10 mg/kg, i.v.) egyes esetekben enyhén csökkentette, máskor egyáltalán nem befolyásolta a patellareflexet. Viszont stabilizálta a reflexaktivitást a válaszról válaszra mutakozó variabilitást csökkentve, még akkor is, amikor a reflexválaszok átlagos amplitúdóját

változatlanul hagyta. Ez néhány esetben igen szembeszökő volt. A tolperizonnal összevetve a szilperizon gátló hatása a patellareflexre gyengébb volt.

1.3.2.3 A patellareflex reticulospinális befolyásolásának vizsgálata macskákön

A tolperizon – a várakozásoknak megfelelően – csökkentette az agytörzsingerléssel kiváltott facilitációt és gátlást egyaránt, míg kismértékben csökkentette az ingerlések közti „nyugalmi” patellareflexet. A tolperizon hatásából többnyire teljes visszatérés volt megfigyelhető a beadás után 60-90 percen belül.

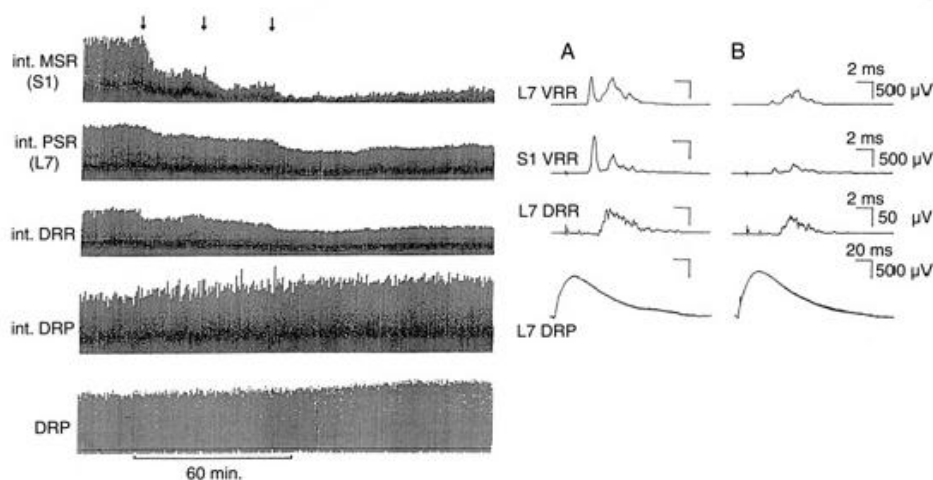
A szilperizonnal folytatott kísérletek némi változatosságot mutattak:

- 1.) Gyakran figyelhattuk meg a „nyugalmi” patellareflex jelentősebb csökkenését.
- 2.) A facilitáló ingerlés alatti patellareflex minden esetben csökkent, ellenben ez a csökkenés erősen változó mértékű volt állatról állatra. Számos esetben a facilitáció eltűnése vagy akár átfordulása gátlásba is előfordult.
- 3.) A gátló agytörzsi ingerlés patellareflex gátló hatását a szilperizon egyes esetekben megnövelte, míg máskor nem befolyásolta.

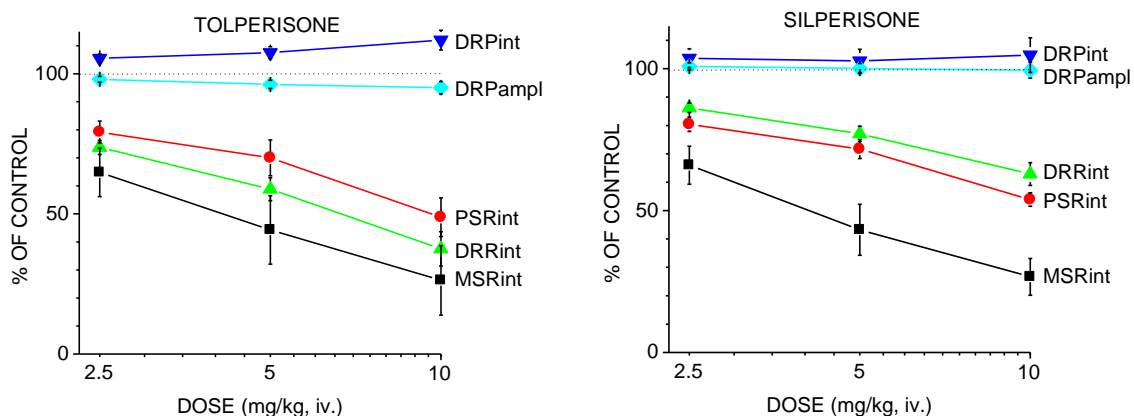
Csak részleges visszatérés volt megfigyelhető 60 percen belül, ami egybevág a szilperizon más kísérletekben megfigyelt hosszabb hatástartamával.

1.3.2.4 Tibialis ideg-ingerléssel kiváltott gerincvelői gyöki potenciálok macskákön

A szilperizon hatásait hasonlítottuk a tolperizonéhoz, baklofenéhez, mephenezinéhez, diazepaméhoz és a midazolamáéhoz. A szilperizon által okozott változások minőségileg hasonlóak voltak a tolperizonéhoz. A monoszínaptikus reflex (MSR), a poliszínaptikus reflex (PSR) és a hátsógyöki reflex (DRR) jelentősen csökkentek, míg a hátsó gyöki potenciál alig változott (3. és 4. ábra). Kvantitatíve, míg a szilperizon hatása az MSR-re, és PSR-re hasonló mértékű volt, a DRR-re kifejtett hatása látványosan gyengébb volt. A többi izomlazítók különböző egyedi és mechanizmus-specifikus hatásmintázatokat mutattak (L. 3. táblázat).



3. ábra A szilperizon hatása a gerincvelői gyöki potenciálokra macskákön. Bal oldalon: integrált regisztrátumai a monoszínaptikus (MSRint) és poliszínaptikus (PSRint) mellsógyöki reflexnek (VRR), a hátsógyöki reflexnek (DRRint) és a hátsógyöki potenciálnak (DRPint). Az alsó sor a hátsógyöki potenciál (DRP) felfele (negatív) kilengéseinek direkt regisztrátumát mutatja. A nyilak a szilperizon egymást követő intravénás adagolását jelzik 2,5, 2,5 és 5 mg/kg dózisokban. Jobb oldalon: Egyedi reflex válaszok (A) adagolás előtt; (B) 20 perccel az utolsó adagolás után.



4. ábra Tolperizon és szilperizon kumulatív dózis-hatás görbéi macskák a gerincvelői gyöki potenciálokra kifejtett hatások alapján. Az eredmények 6 állaton nyert átlagokat (\pm S.E.M) mutatnak. Megfigyelhető, hogy mindkét vegyület azonos mértékű hatást mutatott a mellő gyöki reflexekre, csak a szilperizon gyengébb hatása a DRR-re egy szembetűnő különbség.

3. táblázat. Summary of profiles of different CMR drugs in the cat spinal root potential test

Gyógyszer (legnagyobb dózisa*, i.v.)	MSR	PSR	DRR	DRPint	DRPampl
Mefenezin (50 mg/kg)	0	↓↓	↓↓	↓	↓
Baklofen (0.5 mg/kg)	↓↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↓	↓
Diazepam (3.2 mg/kg)	0	↓↓	↑↑	↑↑	↑
Midazolam (3.2 mg/kg)	0	↓↓	↑↑	↑↑	↑
Tolperizon (10 mg/kg)	↓↓↓	↓↓	↓↓↓	0↑	0
Szilperizon (10 mg/kg)	↓↓↓	↓↓	↓↓	0	0

Megjegyzések:

%-os változás tartománya: 0 [\pm 10]; ↓ [-15-40]; ↓↓ [-40-60]; ↓↓↓ [-60-80]; ↓↓↓↓ [-80-100]; 0↑ [+12]; ↑ [+15-40]; ↑↑ [>50]

*kumulált dózis

MSR: monoszínaptikus reflex; **PSR:** polyszínaptikus reflex; **DRR:** hátsó gyöki reflex; **DRPint:** hátsó gyöki reflex integrálja (görbe alatti terület); **DRPampl:** hátsó gyöki reflex amplitúdó; az MSR-t, PSR-t és DRR-t szintén a görbe alatti terület alapján (integrálva) kvantifikáltuk.

1.3.2.5 Interkollikuláris decerebrációs rigiditás macskák

A tolperizonnal összevetve a szilperizon hatása hasonló volt, azonban hatékonysága kisebb mértékűnek mutatkozott a decerebrációs rigiditás csökkentésében. Ugyanis, 10 mg/kg szilperizon számszerűen 5 mg/kg tolperizonéhoz hasonló mértékű gátlást okozott (4. táblázat).

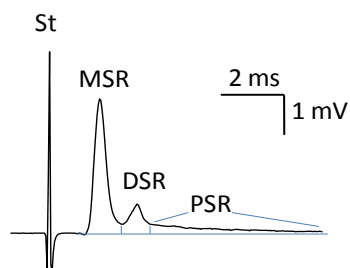
4. táblázat. Szilperizon (n=5) és tolperizon (n=3) interkollikuláris decerebrációs rigiditásra kifejtett hatásainak gátlása macskák. Két esetben a tolperizont 3 órával a szilperizon adagolás után, 1 esetben pedig 2 órával a szilperizon adagolás előtt adtuk.

	Integrált EMG gátlása a kontroll %-ában kifejezve ($\text{átlag} \pm \text{S.E.M.}$)	
	M. quadriceps femoris	M. triceps brachii
Szilperizon 10 mg/kg i.v.	70 \pm 14.9	66 \pm 8.3
Tolperizon 5 mg/kg i.v.	63 \pm 1.7	75 \pm 14.4

1.3.3 Neurofiziológiai vizsgálatok öntudattalan patkányokon

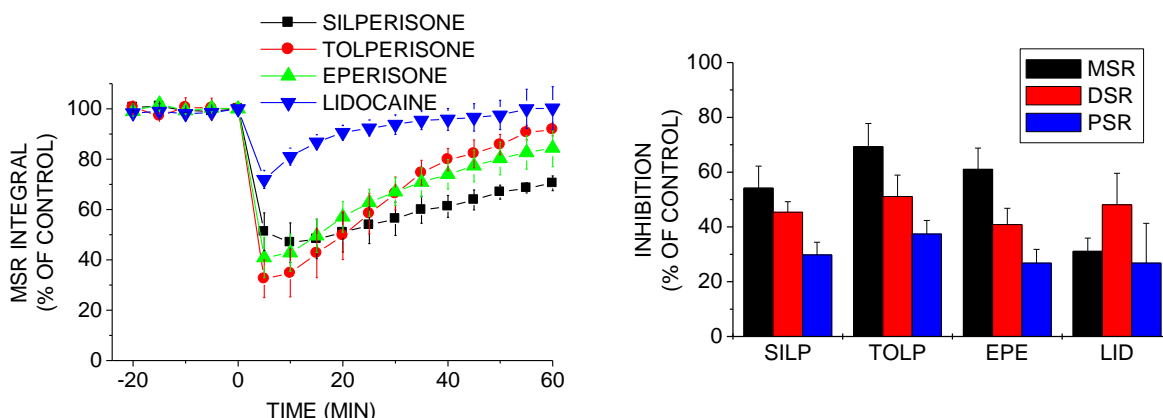
1.3.3.1 Mellsőgyöki reflexpotenciálok vizsgálata

Patkányokon a hátsógyök ingerléssel kiváltott mellsőgyöki reflexen 3 jellemző komponenszt különítettünk el: mono-, di- és polyszinaptikus reflexet (MSR, DSR és PSR, sorrendben; 5. ábra).



5. ábra A hátsógyök ingerléssel kiváltott mellsőgyöki reflex az L₅ szegmentumban, és annak 3 elkülöníthető összetevője.

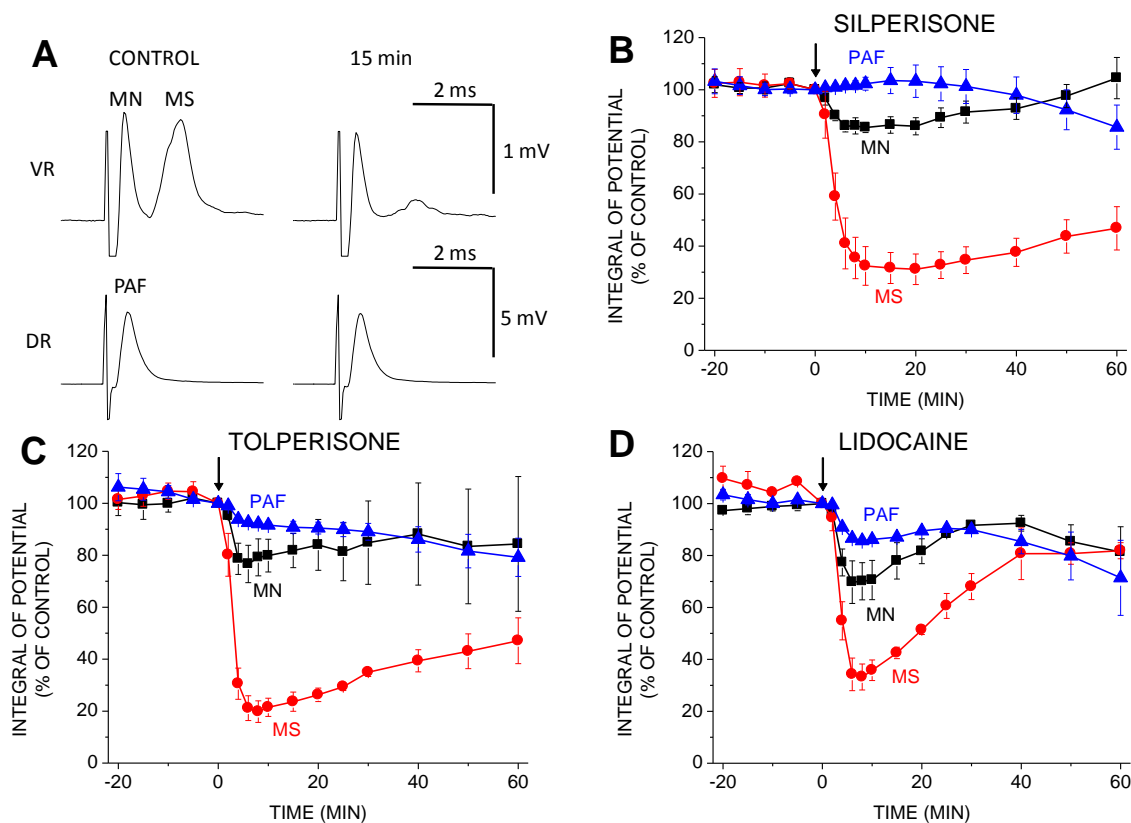
A szilperizon (10 mg/kg, iv.) mindhárom komponenszt csökkentette a következő érzékenységi sorrenddel: MSR>DSR>PSR. A tolperizon, eperizon és szilperizon profilja a három mellsőgyöki reflexkomponensre kifejtett relatív hatékonyság tekintetében nagyon hasonló volt. Ugyanakkor a tolperizonnak volt a legnagyobb csúcshatása, de egyben legrövidebb hatása a tolperizon típusú vegyületek közül. A lidokain profilja jelentősen eltérő volt, mivel ez jelentősen kisebb mértékű gátló hatást fejtett ki az MSR-re, míg a későbbi komponenseket hasonló mértékben gátolta (6. ábra).



6. ábra A vizsgált vegyületek hatása a hátsógyök ingerléssel kiváltott mellsőgyöki reflexre spinális patkányokon. Bal: Négy vegyület (mindegyik 10 mg/kg i.v.) hatásának időbeli lefolyása az MSR-re kifejtett hatás alapján. Jobb: A vegyületek maximális gátló hatása a különböző reflexkomponensekre a beadás előtti kontroll válasz százalékában kifejezve. Minden adat: átlag±S.E.M. öt kísérletből.

1.3.3.2 Neuronális excitabilitási test

A lidokain jelentősen nagyobb csökkentő hatást fejtett ki a motoneuronok (MN) és elsődleges afferensek (PAF) direkt elektromos ingerelhetőségére mint a szilperizon, míg hatékonyságuk a monoszínaptikus áttevődésre (MS) hasonló mértékű volt. A tolperizon profilja a két másiké között volt, mivel ez kismértékben a PAF-t is csökkentette (7. ábra).



7. ábra A vizsgált gyógyszerek hatása a motoneuronok direkt elektromos ingerelhetőségére (MN) és monoszinatikus ingerelhetőségükre (MS), valamint a primer afferensek excitabilitására (PAF). A: átlagolt potenciálok az L_5 mellsőgyökről (felső sor – VR) és az L_5 hátsógyökről (alsó sor – DR), szilperizon (10 mg/kg, i.v.) beadása előtt (bal) és beadása után 15 perccel (jobb). Szilperizon (B; N=5), tolperizon (C; N=3) és lidokain (D; N=3) hatásai az MN-re (■), MS-re (●) és PAF-ra (▲), mind 10 mg/kg i.v. dózissal. Az adatok az adagolás előtti (0 perces) érték százalékában kifejezett eredményekből számolt $\text{átlag} \pm \text{S.E.M.}$ -ként vannak feltüntetve. Nyilak mutatják az adagolás időpontját.

1.3.3.3 Előreható gátlás vizsgálata

A szilperizon (5 mg/kg, i.v.) csökkentette az MSR-t $26.8 \pm 4.9\%$ -kal ($\text{átlag} \pm \text{S.E.M.}$), de a kondicionált és nem kondicionált válaszokat azonos mértékben csökkentette. Így a kondicionálatlan válasz arányában felskálázott gátlási görbe változatlan maradt. Tehát a szilperizon nem befolyásolta az előreható gátlást.

1.3.3.4 Visszakanyarodó (Renshaw) gátlás vizsgálata

A szilperizon (5 mg/kg iv.) nem volt hatással a visszakanyarodó gátlásra sem, míg csökkentette a kondicionálatlan MSR-t $30.9 \pm 6.6\%$ -kal ($\text{átlag} \pm \text{S.E.M.}$).

1.3.3.5 Afferens idegvezetés vizsgálata

A szilperizon és a tolperizon (10 mg/kg, i.v.) gyakorlatilag érintetlenül hagyta a perifériás ideg afferens stimulálásával kiváltott és a gerincvelőbe beérkező összetett afferens A-rost potenciált. A lidokain (szintén 10 mg/kg, i.v.) egy nagyon enyhe, de észlelhető gátló hatást eredményezett, mely mind az összetett akciós potenciál amplitúdójának csökkenésében, mind a vezetési idő növekedésében megnyilvánult. Azonban ez az enyhe csökkenés elhanyagolható volt ahhoz a csökkenéshez képest, melyet a lidokain azonos dózisa a mellsőgyöki reflexben hozott létre.

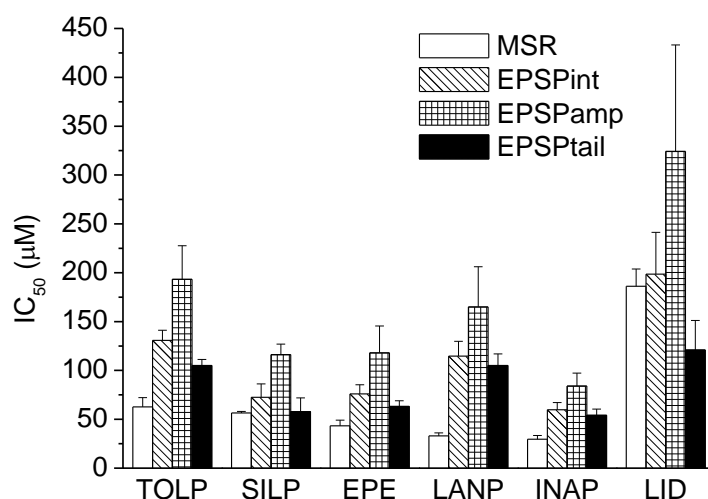
1.3.3.6 Interkollikuláris decerebrációs rigiditás patkányokon

A vénás adagolás utáni maximális hatások tekintetében, a tolperizon (1.5-ször) hatékonyabb volt, mint a szilperizon, ami egybehangzó a macskákon tett megfigyelésekkel.

1.3.4 Izolált félbevágott patkány gerincvelőn végzett *in vitro* vizsgálatok

1.3.4.1 Gerincvelői gyöki potenciálok (*in vitro*)

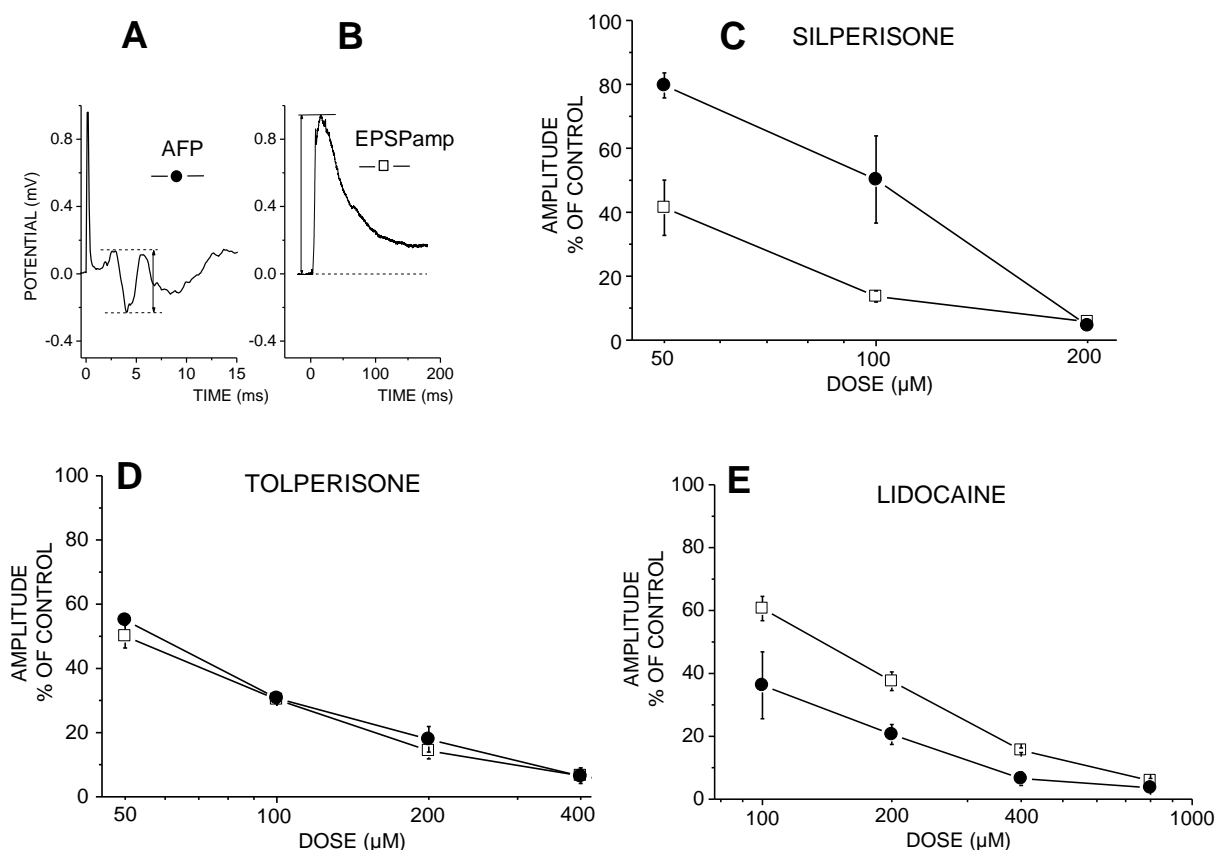
Különböző tolperizon típusú izomlazítók és lidokain hatásait vetettük össze a hátsógyök ingerléssel kiváltott mellső gyöki potenciál (DR-VRP) különböző összetevőire kifejtett hatásmintázatok (profilok) tekintetében. A szilperizon a DR-VRP összes komponensét koncentráció-függő módon csökkentette. Az MSR és az késői EPSP voltak a legérzékenyebb paraméterek, míg a korai EPSP-re kifejtett hatás mérsékeltebb volt. A többi tolperizon típusú vegyület profilja eléggé hasonló volt, de eltérő a lidokainétól (8. ábra).



8. ábra Különböző tolperizon típusú izomlazítók (tolperizon-TOLP, szilperizon-SILP, eperizon-EPE, lanperizon-LANP, inaperizon-INAP) és a lidokain (LID) hatás-profiljai a hátsógyök ingerléssel kiváltott mellső gyöki potenciál (DR-VRP) komponensekre. A vizsgált vegyületek C_{50} értékei a különböző reflex-komponensek gátlása – a monoszinaptikus reflex csúcstól-csúcsig amplitúdója (MSR), az EPSP integrálja (EPSPint), az EPSP amplitúdója (EPSPamp) és az EPSP késői szakaszának (80-180 ms az ingerlés után; EPSPtail) integrálja – alapján. Minden oszlop 4 kísérlet eredményeit (átlag±S.E.M.) ábrázolja.

Egy farmakológiai kísérletben, mely arra irányult, hogy a szilperizon *in vitro* gerincvelői reflexgátló hatásában a GABA-B receptorok esetleges szerepét vizsgálja, a GABA-B antagonist SCH-50911 nem fordította vissza a szilperizon hatását.

Az afferens idegvezetésre és a szinaptikus áttevődésre gyakorolt csökkentő hatások összefüggéseinek elemzése céljából dózis-hatás vizsgálatokat végeztünk az afferens rost potenciál (AFP) és a DR-VRP EPSP komponense párhuzamos regisztrálásával és a szilperizon, tolperizon és lidokain összehasonlító vizsgálatával. Habár mindhárom vegyület csökkentette mind az AFP-t, mind az EPSP amplitúdót, a szilperizon preferenciálisan az EPSP-t csökkentette, míg a lidokain az AFP-t csökkentette erősebben. A tolperizon profilja a másik kettőé között volt, mivel ez egyforma mértékben csökkentette mind az AFP-t, mind az EPSP-t (9. ábra).



9. ábra A szilperizon, tolperizon and lidokain hatásai a populációs EPSP-re és az afferens rost potenciálra (AFP). Ezeket a kísérleteket 31-33 °C-os szervfürdő hőmérséklet mellett végeztük a monoszintaptikus reflex tüzelés megszüntetése céljából. Az L₅ hátsógyököt ingereltük (0.2 mA; 0.1 ms). A: AFP. B: populációs EPSP az L₅ mellsőgyökről elvezetve. C-E: a 3 vizsgált anyag dózis-hatás görbéi az AFP csúcstól-csúsig amplitúdója (●) és az EPSP alapvonal-csúcs amplitúdója (□) alapján. Minden pont 3 kísérlet átlagát (±S.E.M.) mutatja 3 kísérlet alapján.

1.3.4.2 Gerincvelő „grease-gap” vizsgálata (in vitro)

Gerincvelőseletek NMDA (80 μM) vagy AMPA (40 μM) adásával kiváltott depolarizációját 100 μM szilperizon nem befolyásolta.

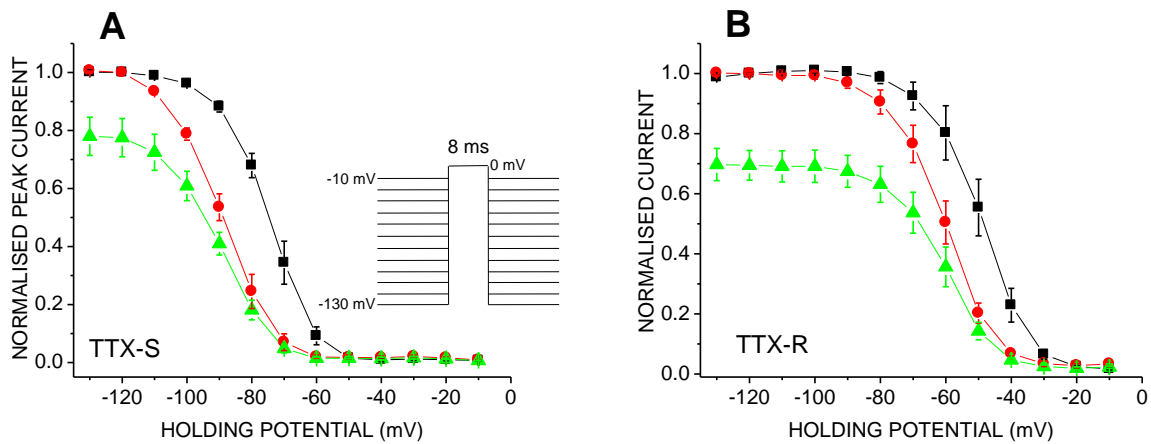
1.3.5 Feszültség-függő csatornákra kifejtett hatások elemzése patch-clamp módszerrel

1.3.5.1 Feszültségfüggő nátrium csatornákra kifejtett hatások

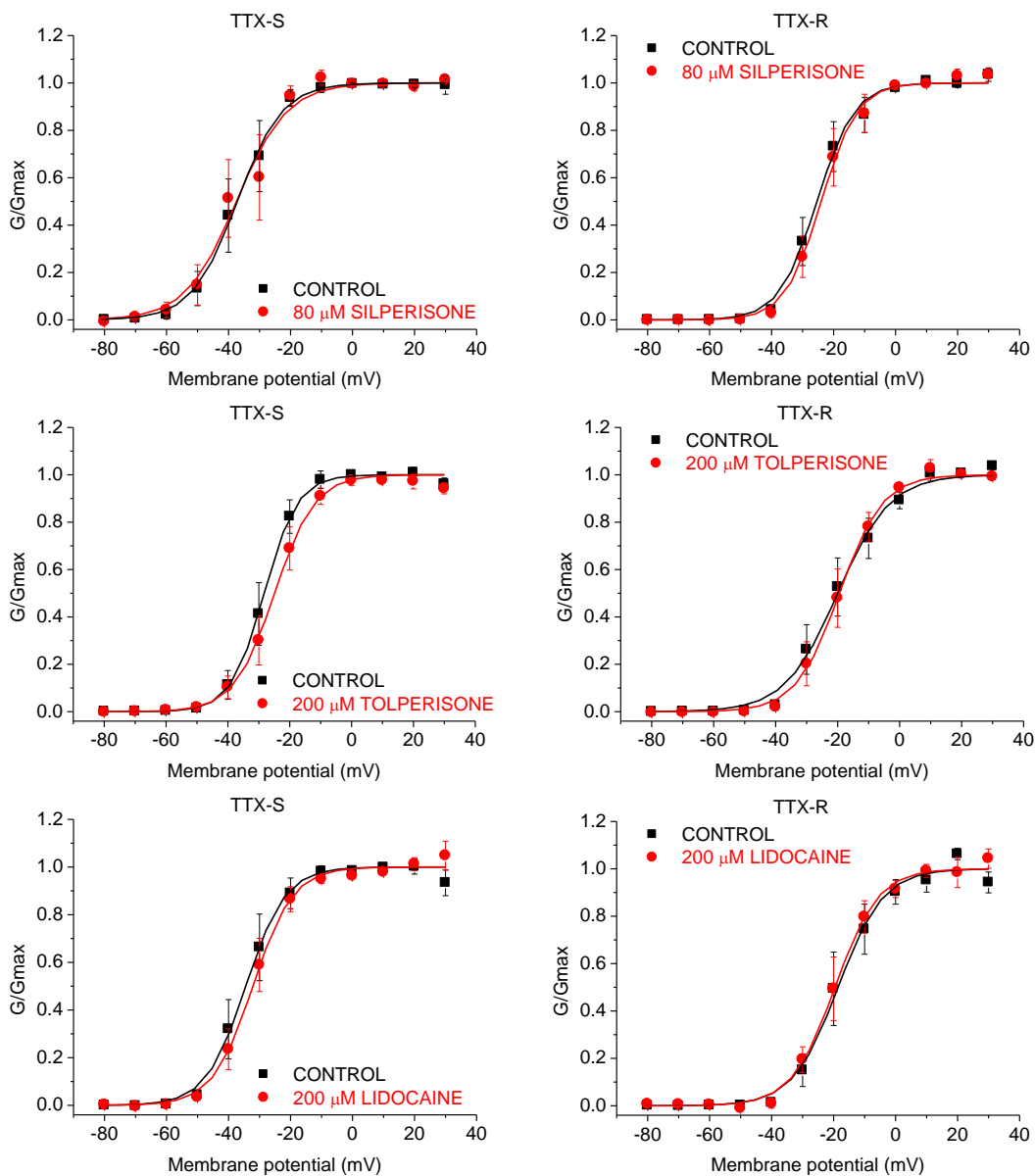
A szilperizon és a tolperizon mind tetrodotoxin rezisztens (TTX-R), mind tetrodotoxin szenzitív (TTX-S) Na⁺ csatornák „steady state inaktivációs” görbéit hiperpolarizációs irányba tolta el, állapotfüggő csatornablokkoló hatást jelezve, habár a maximális elérhető áram is csökkent (10. ábra)

Sem a szilperizon sem a tolperizon sem a lidokain nem tolta el a nátrium csatornák aktivációs feszültség-függését (11. ábra).

Végül, összehasonlítottuk a szilperizon, tolperizon és lidokain Na⁺ csatornablokkoló hatékonyságát TTX-S csatornákon -80 mV-os, TTX-R csatornákon -60 mV tartófeszültség mellett. Az eredmények az 5. táblázatban vannak összegezve. Összefoglalva, míg a tolperizon Na⁺ csatornablokkoló hatékonysága a lidokainéhoz hasonló, a szilperizon náluk 2,5-3-szor hatékonyabb.



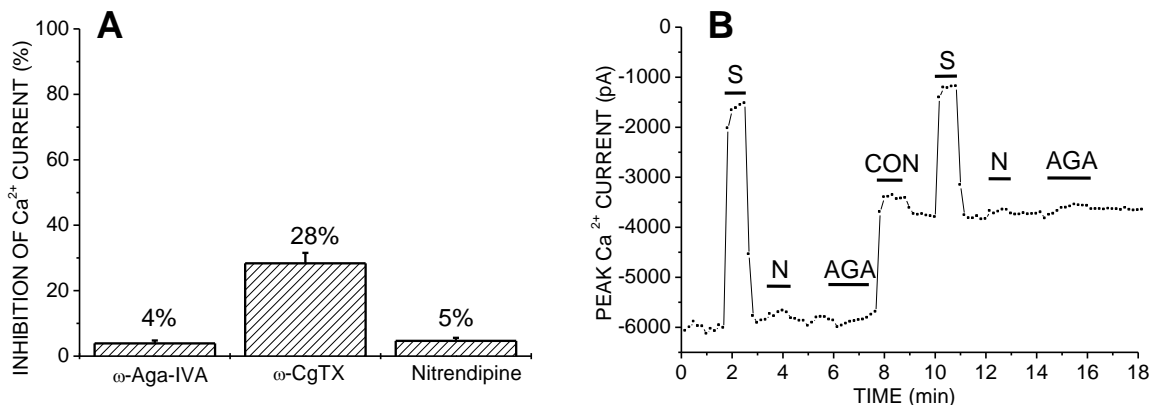
10. ábra Szilperizon (80 μM) hatása a “steady-state inaktivációs” görbékre TTX-S (A) és TTX-R (B) Na^+ csatornákat kifejező sejteken. Átlagolt, normalizált “steady-state inaktivációs” görbék kontroll oldatban (■), szilperizon 80 μM adagolása alatt a -120 mV tartófeszültségnél mért kontroll csúcsáramhoz normalizálva (▲) és az utóbbi felskálázva (●), azaz a szilperizon mellett -120 mV tartófeszültségnél mért csúcsáramhoz normalizálva.



11. ábra Szilperizon, tolperizon és lidokain hatása érzőidegsejtek TTX-S és TTX-R Na^+ csatornáinak aktivációs görbéire (normalizált vezetőképesség [G/G_{max}] – lépcsőfeszültség grafikonok). Átlag \pm S.E.M. van ábrázolva (N=6-7).

1.3.5.2 Feszültségfüggő kalcium csatornákra kifejtett hatások

Szilperizon gátolta a hátsógyöki ganglion (DRG) sejtek feszültségfüggő kalcium áramát, nem anti-rundown kiegészítést tartalmazó körülmények mellett a nátrium csatornablokkoló hatásokéhozhoz hasonló IC_{50} értékekkel. IC_{50} értéke anti-rundown kiegészítés mellett kétszer volt magasabb, mint IC_{50} -e TTX-S Na^+ csatornákon -80 mV tartó potenciál mellett (5. táblázat). A Ca^{2+} csatorna blokkolás mértéke nem függött lényegesen sem a tartó potenciáltól, sem az aktivációs feszültségtől.



12. ábra Effects of various calcium channel blockers on HVA calcium currents in DRG cells (CPK supplemented condition). A: The amount of blockade provided by different subtype selective Ca^{2+} channel blockers: nitrendipine (N, 10 μ M, L-type selective), ω -conotoxin-GVIA (CON, 3 μ M, N-type selective) and ω -agatoxin-IVA (AGA, 0.1 μ M, P-type selective). Data are mean \pm S.E.M. from 4-9 cells. B: Effect of szilperizon (S, 320 μ M) compared with those of specific blockers in a representative experiment. Szilperizon blocked also drug resistant (R-type) calcium currents, which were abundant in these DRG cells.

Szilperizon (320 μ M) a DRG sejtek Ca^{2+} áramának jelentős hányadát blokkolta, ami mind N típusú, mind R típusú csatornák közvetítette áramokat magába foglalt, míg a megfigyelt áramokat L vagy P/Q típusú Ca^{2+} csatornák nem közvetítették számottevő mértékben (12. ábra).

A szilperizonnal, tolperizonnal és lidokainnal végzett összehasonlító koncentráció-hatás vizsgálatok megközelítőleg a tolperizon 6,5-szer gyengébb hatékonyságát mutatták a szilperizonhoz képest, míg a lidokain valamicske, de így is 20%-nál kisebb gátló hatást csak igen magas, 1000 μ M-os koncentrációnál tudott elérni. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a szilperizon farmakodinámiás hatásához a Na^+ és Ca^{2+} csatorna blokkolás hasonló mértékben hozzájárulhat. A tolperizon esetében a Na^+ csatorna blokkolás mellett némi Ca^{2+} csatorna blokkolás valamit hozzátehet a hatáshoz, míg a lidokain esetében a Ca^{2+} csatorna blokkolás elhanyagolható lehet a Na^+ csatorna blokkolás mellett.

1.3.5.3 Feszültségfüggő kálium csatornákra kifejtett hatások

Főleg késői egyenirányító K^+ áramokat figyeltünk meg a vizsgált közepes méretű DRG sejtekben. A szilperizon aktiváló feszültségtől független mértékben csökkentette a K^+ áramokat. A szilperizonnal, tolperizonnal és lidokainnal végzett összehasonlító koncentráció-hatás vizsgálatok során a szilperizonnal egyértelmű (18%-os) gátlást találtunk már 40 μ M koncentrációnál, míg 320 μ M-nál a szilperizon már tekintélyes (>50%) K^+ csatornablokkoló hatást mutatott. A tolperizon és lidokain K^+ csatornablokkoló hatékonyságai sokkal gyengébbek voltak, az (extrapolált) IC_{50} értékek 1000 μ M fölé becsülhetők.

5. táblázat. Főbb in vitro hatékonyságok (IC₅₀-ek) összehasonlító táblázata a szilperizonra, tolperizonra és lidokainra.

	Gerincvelői reflex (<i>in vitro</i>)		Feszültségfüggő csatorna blokkolás (patch-clamp)			
	MSR	EPSPint	TTX-S Na ⁺	TTX-R Na ⁺	Ca ²⁺	K ⁺
	IC ₅₀ (μM)					
SZILPERIZON	57	73	101	64	217	245
TOLPERIZON	63	131	162	255	1390	1801*
LIDOKAIN	186	198	256	209	4580*	3782

*távoli extrapoláció (bizonytalan becslés)

1.4 Következtetések összefoglalása

1. A GYKI-20039 tremor teszt alkalmasnak látszik antispasztikus gyógyszerek kívánt hatékonyságának és a hatás időbeli lefolyásának vizsgálatára egereken.
2. Az a tesztcsomag, mely a GYKI-20039 tremor tesztet alkalmazza a kívánt hatékonyságok mérésére és a lokomotor aktivitás, a rotarod, a thiopental alvásidő és az újonnan kifejlesztett súlyemelés tesztet alkalmazza a nemkívánatos mellékhatások – szedáció és motoros funkciókárosodások – jellemzésére, alkalmasnak látszik centrális izomlazítók kritikus terápiás indexeinek megbecslésére.
3. Az összes klinikai gyakorlatban használt izomlazító valamilyen tekintetben szűk terápiás indexet mutatott.
4. A szilperizon viszonylag kiemelkedő terápiás indexet mutatott az izomlazító gyógyszerek között.
5. A használt neurofiziológiai tesztek közül a flexorreflex teszt macskákon bizonyult különösen alkalmasnak centrális izomlazítók farmakodinámiai jellemzésére, mivel hosszú távú stabilitást mutatott és érzékeny volt az összes ismert centrális izomlazító hatására.
6. A legtöbb centrális izomlazító, beleértve a tolperizon típusúakat, hasonlóan hatékony flexor reflex gátló hatékonyságot mutatott spinális és ép neuraxisú macskákon, azt sugallva, hogy hatásuk elsődleges célpontja a gerincvelőben van. Ez alól a diazepam és a carisoprodol voltak kivételek.
7. A gerincvelői mellső- és hátsógyöki reflexpotenciáljainak vizsgálata mechanizmus-specifikus hatásmintázatokat mutatott különböző centrális izomlazítóknál.
8. A tolperizon típusú vegyületek a gátolták a szegmentális gerincvelői reflexaktivitást mind *in vitro*, mind *in vivo*. Hatásprofiljuk egymáshoz nagyon hasonló volt, de eltérő a lidokainétól, mely a monoszínaptikus reflexet gyengébben gátolta.
9. A különböző gerincvelői reflex vizsgálatokban a szilperizon a tolperizonhoz hasonló hatékonyságot és többé kevésbé hasonló hatásprofilot mutatott i.v. alkalmazás után; viszont hatása sokkal tartósabb volt és ezért sokkal hatékonyabb volt orális vagy intraduodenális adagolás mellett, azaz nagyobb funkcionális biohasznosulást ért el.
10. Azonban kisebb, de egyértelmű különbségek is megmutatkoztak a szilperizon és a tolperizon hatásprofiljában: (a) a szilperizon kevésbé erős gátló hatása a hátsógyöki reflexre (mely az afferens excitabilitást tükrözi); (b) mindkét vegyület gátolta a retikulospinális facilitációt, de csak a tolperizon gátolta a retikulospinális gátlást; (c) a szilperizon kevésbé csökkentette a decerebrációs rigiditást.
11. A lidokain, tolperizon és szilperizon, mind kifejtett valamennyi hatást a primér afferensek, és motoneuronok excitabilitására és a motoneuronok EPSP-jére *in vitro*
12. A szilperizon relatíve gyengébb hatással bírt a primér afferens és motoneuron excitabilitásra és relatíve erősebbel a korai EPSP-re és a monoszínaptikus reflexre, mint a lidokain, míg a tolperizon profilja a szilperizoné és lidokainé között volt.

13. A szilperizon nem mutatott sem GABA-B agonista sem AMPA vagy NMDA antagonistá hatásokat az izolált patkány gerincvelő preparátumon, ami arra utal, hogy EPSP gátló hatása valószínűleg preszinaptikus glutamát felszabadulás gátlás eredménye, mely nem GABA-B agonista hatásnak köszönhető.
14. A szilperizon láthatóan nem befolyásolta a GABA és glicin receptor mediált előreható és visszakanyarodó gátlásokat sem a gerincvelőben.
15. A szilperizon, tolperizon és lidokain koncentráció-függő blokkoló hatásokat mutattak DRG idegsejtek tetrodotoxin szensitiv és tetrodotoxin rezisztens Na^+ csatornáin a helyi érzéstelenítőkéhez hasonló karakterisztikával. Hatékony koncentrációik hasonlóak voltak az *in vitro* reflex gátló koncentrációkhoz azt sugallva, hogy a Na^+ csatorna blokkolás vezető hatástényező lehet reflexgátló hatásukban.
16. A szilperizon DRG idegsejtek N és R típusú Ca^{2+} áramait is gátolta, mely hatások a Na^+ csatorna blokkoló koncentrációkkal összevethető koncentrációknál jelentkeztek, ami azt sugallja, hogy a valószínűleg a Ca^{2+} csatorna blokkolás is részt vesz farmakodinámiás profilja kialakításában, például relatív erősebb hatásában a (mono)szinaptikus átvitelre és az EPSP-re (in vivo és in vitro), mint az afferens rostok excitabilitására vagy mint a lidokainnal összevetésben.
17. A lidokain Ca^{2+} csatorna blokkolása elhanyagolható volt releváns és jelentős Na^+ csatorna blokkoló hatást mutató koncentrációknál, míg Ca^{2+} csatorna blokkoló hatás tekintetében a tolperizon a szilperizon és a lidokain között volt, azt sugallva, hogy a Ca^{2+} csatorna blokkolás kismértékben hozzájárulhat farmakodinámiás hatásához, a preszinaptikus serkentő transzmitter felszabadulást így módon is csökkentve.
18. A szilperizon DRG idegsejtek K^+ áramait is gátolta valamennyivel kisebb hatékonysággal, de átfedéssel a Na^+ csatorna blokkoló koncentrációkhoz képest. A tolperizon és a lidokain ilyen hatásai valószínűleg elhanyagolható mértékűek.
19. Összességében eredményeink szilperizonra egy jobb farmakodinámiás profilt mutattak akár a tolperizonnal, akár más centrális izomlazítókkal összevetésben.
20. A tolperizonhoz viszonyított sok hasonlóság mellett a kis farmakodinámiás különbségek megmagyarázhatóak lehetnek feszültség-függő csatorna blokkoló profiljaikkal, például azzal, hogy a szilperizon hatása kevésbé korlátozódott csak a Na^+ csatorna blokkoló hatásra.

1.5 Hivatkozások

1. Dulin J, Kovacs L, Ramm S, Horvath F, Ebeling L, Kohnen R (1998) Evaluation of sedative effects of single and repeated doses of 50 mg and 150 mg tolperizon hydrochloride. Results of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pharmacopsychiatry* **31**, 137-142.
2. Forscher P, Oxford GS (1985) Modulation of calcium channels by norepinephrine in internally dialyzed avian sensory neurons. *J.Gen.Physiol* **85**, 743-763.
3. Miskolczi P, Vereczky L, Frenkl R (1987) Gas-liquid chromatographic method for the determination of tolperizon in human plasma: pharmacokinetic and comparative bioavailability studies. *J.Pharm.Biomed.Anal.* **5**, 695-700.
4. Novack GD (1982) Studies on the efficacy and depressant potential of muscle relaxants in mice. *Drug Development Research* **2**, 383-386.
5. Pratzel HG, Alken RG, Ramm S (1996) Efficacy and tolerance of repeated oral doses of tolperizon hydrochloride in the treatment of painful reflex muscle spasm: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *Pain* **67**, 417-425.
6. Stamenova P, Koytchev R, Kuhn K, Hansen C, Horvath F, Ramm S, Pongratz D (2005) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy and safety of tolperizon in spasticity following cerebral stroke. *Eur.J.Neurol.* **12**, 453-461.

2 2. Fejezet: Migrén preklinikai modellezése

2.1 Bevezetés

A migrén egy megnyomorító fejfájásos rendellenesség, melyet közepestől súlyosig terjedő intenzív lüktető fájdalom jellemez.

Bár a legújabb kutatások számos részletet feltártak a migrén létrejöttében résztvevő mechanizmusokról, az elsődleges elindító jelenségek és a háttérben álló idegi és vaszkuláris mechanizmusok és ezek összefüggései nem világosak, magyarázatukra számos vitatott teória született: a migrén vaszkuláris-, idegi- és neurogén gyulladásos elméletei (Moskowitz 1993; Messlinger *et al.* 2011; Ashina 2012; Nosedá and Burstein 2013).

Egy jól megalapozott elméleti háttér hiányával összhangban számos modellt javasoltak, mint hasznos eszközöket új migrén ellenes gyógyszer jelöltek tesztelésére állatokon, illetve a humán farmakodinámiai vizsgálatokban. Ezek közül a legszélesebb körben tanulmányozott és elfogadott modell a migrén nitroglicerinnel (NTG) indukált modellje (Olesen and Jansen-Olesen 2012).

A jelen tanulmány a migrén NTG modelljeivel foglalkozik. NTG adagolás azonnali fejfájást okoz egészséges személyeknél, míg migrénes személyeknél késleltetve migrén-szerű fejfájást is kivált (Thomsen *et al.* 1994; Olesen 2008; Ashina *et al.* 2013). Az azonnali fejfájást egészséges önkénteseken szignifikánsan csökkentette a szumatriptán (Iversen és Olesen 1996), míg a valproát migrénesekben csökkentette a késleltetett fejfájás incidenciáját (Tvedskov *et al.* 2004).

Az állatokon NTG indukálta migrén modellek beállítására irányuló kísérleti munkák nagy részét patkányokon végezték, a hatást különböző kimeneteli végpontokkal detektálva. Sokkal korlátozottabb tapasztalat áll rendelkezésre az NTG modellre vonatkozóan egerekben. Jelen vizsgálatunk célja az volt, hogy kritikusan felmérjük, mely mérési végpontok használhatók egerekben, részben korábbi tapasztalatok leellenőrzésével, részben olyan végpontokat is bevonva, melyeket eddig egerekben nem vizsgáltak, mint például nNOS kifejeződés a trigeminális ganglionokban (TRG) és a trigeminális *nucleus caudalis*-ban (TNC), vagy az arc túlérzékenysége, ami a migrén relevánsabb indukátora lehet, mint a talp hiperalgéria.

Volt egy zavaró tényező korábbi vizsgálatok során, mely szintén meghatározta célkitűzéseinket. Különböző vizsgálatokban eltérő NTG készítményeket használtak; ennek ellenére, számos korábbi vizsgálatban a különbözőképpen formulált NTG-vel kezelt csoportokat egyszerű sóoldattal kezelt kontroll csoporthoz hasonlították megfelelő vivőanyag kontroll helyett (Bates *et al.* 2010; Di *et al.* 2015; Srikiatkachorn *et al.* 2002; Tassorelli *et al.* 2003; Tassorelli *et al.* 2006). Egy előző tanulmányunkban megfelelő kontroll vivőanyag híján mi is ezt tettük (Markovics *et al.* 2012), miközben az NTG-t a Nitrolingual nevű készítmény formájában alkalmaztuk. Azonban a jelen vizsgálatokban jól kontrollált NTG modellek beállítása végett célunk megfelelő vivőanyag kontroll alkalmazása is volt. Ebből a célból tisztáztuk a Nitrolingual összetételét és a kontroll kísérletekhez egy megfelelő vivőanyagot állítottunk össze. Ezen kívül, kísérleteinket két különböző NTG készítménnyel kezdtük – Nitrolinguallal és Nitro Pohl-val – melyek közül az utóbbiról azt gondoljuk, hogy az NTG készítmény választékból talán a leginkább közömbös (hatástalan) oldószerrel rendelkezik.

Hat különböző típusú vizsgálatot végeztünk. Az első kettőben, melyek a fénykerülő magatartás és az intrakraniális véráramlás vizsgálatát foglalták magukba, mindkét NTG készítményt kipróbáltuk. Azonban a szerzett tapasztalatok alapján a Nitrolingualt a további kísérletekből kizártuk.

2.2 Anyagok és módszerek

2.2.1 Gyógyszerkezelések és vivőanyagok

Két NTG készítményt alkalmaztunk: Nitrolingual aeroszolt és Nitro Pohl-t. Nitrolingual kontroll vivőanyagát a Richter Gedeon Nyrt.-ben állították össze a következő összetevőkből (súlyszázalékban): Miglyol-812 77.3%, etanol 20%, glicerin kaprilát 2% és borsmenta olaj 0.7%.

A Nitro Pohl oldat 1 mg/ml NTG-t tartalmazott 10 ml/kg dózistérfigattal adtuk be 10 mg/kg i.p. dózis elérésére. Az NTG mellett, a Nitro Pohl vizes oldata 49 mg/ml glükóz-monohidráttal tartalmazott. A Nitro Pohl kontroll vivőanyagaként Rindex 5 oldatot használtunk. Módszervalidáláshoz migrén ellenes gyógyszerként szumatriptán szukcinátot és topiramátot használtunk.

2.2.2 Fénykerülés teszt

Egerek NTG adását követő fénykerülő magatartását vizsgáltuk, annak korai (0-30. perc) és késői fázisát (90-120. perc). Az egereket egyenként vizsgáltuk egy két-térfeles kamrába helyezve, melynek egyik oldala sötét, másik erősen megvilágított volt. A két egyaránt 30 perces megfigyelési periódust korábbi hasonló kísérleteink tapasztalatai alapján határoztuk meg (Markovics *et al.* 2012).

A korai vizsgálati szakasz leteltével az egereket lakóketrecükbe helyeztük vissza, majd 90 perccel az NTG kezelés után újra a világos-sötét kamrába tettük a késői szakaszban mutatott viselkedésük megfigyelésére. A kísérleteket digitális kamerával rögzítettük és az értékelést a kezelés szempontjából vakosított vizsgáló végezte a videofelvétel alapján. A világos térfélen töltött időt mértük és a százalékban kifejezett világos térfél-időt számítottuk és ábrázoltuk.

2.2.3 Kraniális véráramlás kísérletek

Hím egereket altattunk uretánnal és 38 °C-on tartott fűtőpadra helyeztük. Egy kanült helyeztünk a légcsőbe. Az egerek spontán lélegeztek az egész kísérlet alatt. A kraniális véráramlást non-invazív lézer Doppler szkennel (PIM II rendszer, Perimed AB, Svédország) segítségével vizsgáltuk. A szkennel összegzett átlagos mikrocirkulációs áramlást mért önkényes egységben, belemérve a hajszálerek, arteriolák, venulák és sönt-véredények véráramlását az agyhártyákban és a felületes agykéregben. A perfúzió változását a kiindulási érték százalékában fejeztük ki. Az alapáramlás stabilizálódása után NTG-t (10 mg/kg Nitrolingualt vagy Nitro Pohlt), vagy megfelelő vivőanyagot adtunk és a regisztrálást 4 órán át folytattuk.

2.2.4 A TNC és a TRG immunohisztokémiai vizsgálata

Három csoport egérnek adagoltunk i.p. NTG-t (10 mg/kg Nitro Pohl-t), egynek pedig vivőanyagot (10 ml/kg Rindex 5; N=6/csoport). Két NTG-kezelt csoportot szumatriptánnal (2x5 mg/kg 30 perccel NTG előtt és után) illetve topiramáttal (80 mg/kg 30 perccel NTG előtt) is kezeltünk. Két órával az NTG illetve vivőanyag injekciót követően az egereket transzkardiálisan perfundáltuk 20 ml 0,1 M nátrium-foszfát-pufferelt sóoldattal (PBS; pH=7,6), majd fixáló (150 ml jéghideg 4% -os paraformaldehid) oldattal. Ezt követően a trigeminális *nucleus caudalis*-t (TNC) és trigeminális ganglionokat (TRG) c-Fos and nNOS immunohisztokémiai feldolgozásnak vetettük alá.

2.2.5 Termális hiperalgémia mérése a mancson hot-plate tesztel

Hot-plate tesztel vizsgáltunk egereket. Az állatokat a fűtött lapra helyeztük és a hátsó mancs nyalogatásáig vagy a forró lapról való elugrásig eltelt időt mértük, mint válaszreakcióidőt. A megengedett maximum 60 másodperc volt. A válaszreakcióidőt 60 perccel előtte, illetve 60, 120, 180 és 240 perccel az NTG (10 mg/kg, i.p.) vagy kontroll vivőanyag injekcióját követően mértük meg.

2.2.6 Mechanikai allodynia mérése mancson von Frey szálakkal

Egerek mancsvisszahúzási küszöbértékeit vizsgáltuk a hátsóláb talpának von Frey-szál ingerlése révén fel-és-le paradigma szerinti méréssel (Chaplin *et al.* 1994). Egy 10 szálból álló növekvő merevségű (0,008 g – 2,0 g) von Frey szál sorozatot (Stoelting Co., USA) alkalmaztunk a hátsó mancson. Az 50% -os mancs visszahúzási küszöbértéket (PWT grammal kifejezve) határoztuk meg. NTG-t (10 mg/kg Nitro Pohl) vagy vivőanyagot injektáltunk, és a PWT mértük előtte, illetve 60, 120, 180 és 240 perccel a beadás után.

2.2.7 Orofaciális fájdalomérzékenység mérése von Frey szálakkal

Az egereket 9 cm hosszú mozgáskorlátozó üveghengerbe helyeztük. Egy 0,4 g merevségű von Frey-szálal nyomtunk a jobb oldali bajuszpárnának 12-szer megközelítőleg 90°-os szögben, amíg

meghajlott (Krzyzanowska *et al.* 2011). A válaszokat pontoztuk. Az állatokat öt csoportba osztottuk és NTG-t (10 mg/kg Nitro Pohl-t, négy csoportban) vagy vivőanyagot (egy csoportban) injektáltunk i.p. Harminc perccel később különböző dózisú szumatriptánt (0,3-3 mg/kg) vagy fiziológiás sóoldatot (kontroll) injektáltunk szubkután a NTG-vel kezelt állatoknak illetve sóoldatot a vivőanyaggal kezelt állatoknak. Ezután a von Frey vizsgálatot megismételtük 60, 90 és 120 perccel az NTG adás után.

2.3 Eredmények

2.3.1 Fénykerülés teszt

A fiziológiás sóoldattal kezelt egerek nem mutattak semmilyen nyilvánvaló változási tendenciát a megvilágított rekeszben töltött átlagos idő tekintetében sem a korai sem a késői fázisban, habár a késői fázisban kevesebb időt töltöttek a világos oldalon. Ezzel szemben a korai fázisban a világosban töltött idő jelentősen csökkent mind a Nitrolinguallal, mind annak vivőanyagával kezelt csoportban, ami arra utal, hogy elsősorban a Nitrolingual oldószere váltott ki gyorsan kifejlődő fotofóbiát. Mindazonáltal, a késői fázisban nem volt számottevő különbség a sóoldattal, a Nitrolingual vivőanyaggal és a Nitrolinguallal kezelt csoportok fénykerülő viselkedése között. A Nitro Pohl-lal végzett kísérletben, eltekintve a fényen töltött idő mérsékelt fokozatos csökkenésétől az injekció nem okozott nyilvánvaló hatást sem a korai, vagy a késői fázisban. Legfontosabban, nem találtunk szignifikáns különbséget az NTG csoportok és az egyidejű megfelelő vivőanyag kontroll csoportok között.

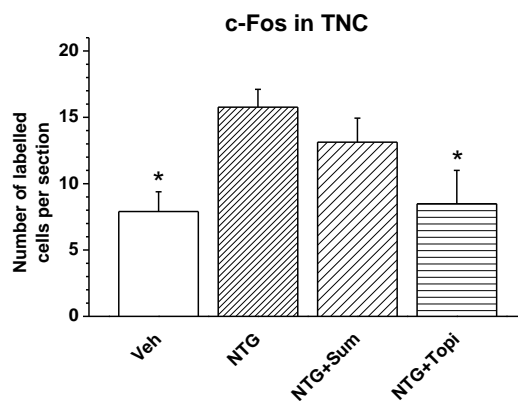
2.3.2 Kraniális véráramlás teszt

A kiindulási véráramlások abszolút értékei nem különböztek szignifikánsan a megfelelő NTG és vivőanyag csoportok között. A Nitrolingualnak, és vivőanyagának injekciója egyaránt fokozatos kraniális véráramlás növekedést indított el. A növekedés körülbelül 20%-os mértékű volt 120 perccel az injekció után és fenntartott maradt a teljes 4 órás megfigyelési időszak alatt mindkét csoportban. Nem volt nyilvánvaló különbség Nitrolingual vagy annak vivőanyaga által kiváltott változások között. Ezzel szemben, a Rindexnek, azaz a Nitro Pohl kontroll vivőanyagának injekciója, nem okozott lényeges változást a kraniális véráramlásban, és nem volt szignifikáns különbség a Nitro Pohl és a vivőanyag kontroll csoport között sem. Tehát nem tudtuk az NTG szignifikáns hatását detektálni megfelelő kontroll csoportokkal összevetve. Miután azt észleltük, hogy oldószere önmagában jelentős hatásokat vált ki, a Nitrolingualt kizártuk a további vizsgálatainkból.

2.3.3 c-Fos és nNOS hisztokémiai vizsgálatok

A c-Fos pozitív sejtmagok számlálása a TNC-ben statisztikailag szignifikáns kétszeres növekedést jelzett NTG (Nitro Pohl) kezelést követően a vivőanyag kontroll (Rindex) csoporthoz képest. Azonban statisztikailag szignifikáns növekedés nem volt kimutatható a TRG-ben. Az NTG-kezelt csoporttal összehasonlítva, a magas dózisú sumatriptan (5 mg/kg, s.c.) beadása az NTG injekció előtt és után nem fordította vissza jelentősen a megnövekedett c-Fos expressziót a TNC-ben. Ezzel szemben, a topiramáttal (80 mg/kg, i.p.) való előkezelés teljesen megakadályozta a c-Fos expresszió NTG-indukálta növekedését a TNC-ben, mely hatás szignifikáns volt (13. ábra).

Az nNOS immunfestéses vizsgálatok nem mutattak ki NTG injekcióval kiváltott szignifikáns változásokat vagy a migrén elleni gyógyszerekkel kiváltott hatásokat. Az nNOS pozitív sejtek száma meglehetősen alacsony változékonyságot mutatott a TNC-ben, de sokkal nagyobbakat a TRG-ben.



13. ábra Nitroglicerín (NTG; 10 mg/kg i.p.) hatása vivőanyagával (Veh) összehasonlítva kvantitáiv cFos immunhisztokémiával a trigeminális nucleus caudalisban (TNC); és a szumatriptán (Sum; 2x5 mg/kg, s.c.) illetve a topiramát (Topi; 80 mg/kg, i.p.) hatása NTG-vel injektált egerekben. Az adatok Átlag±SEM (N=5-6/csoport). A csillagok statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatnak az NTG csoporthoz képest (*p < 0,05; egyutas ANOVA, majd Dunnett-féle teszt).

2.3.4 Termális hiperalgéria a mancson hot-plate teszttel mérve

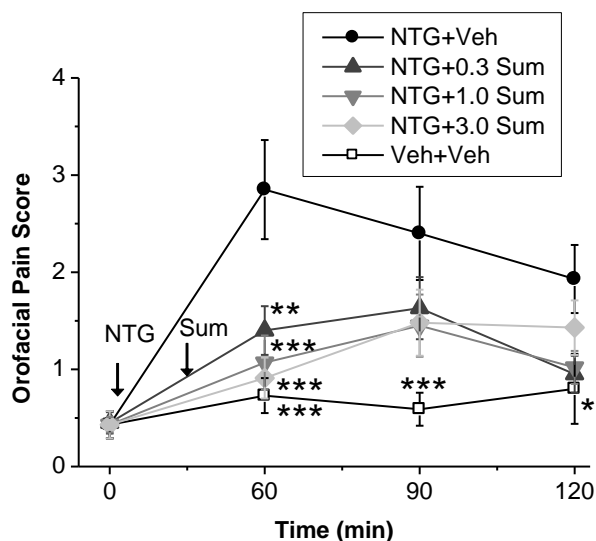
A vivőanyaggal kezelt egerek válaszreakcióidője az ismételt tesztek során 240 percig nagyon stabilak voltak. Az NTG injekció egyértelmű hiperalgériát okozott, ami csökkent védekező válaszreakcióidőben nyilvánult meg, mely hatás 60 perccel a beadás után volt maximális és statisztikailag szignifikáns. A hatás 180 percre teljesen elmúlt, késleltetett másodlagos hiperalgéria hullám nem jelentkezett.

2.3.5 Mechanikai allodynia mancson

A mancsvisszahúzási küszöbértékek az NTG hatásának hasonló időbeli lefolyását mutatták, mint hot-plate tesztnél. Habár a vivőanyag kontrollcsoport mechanikai küszöb adatai nagyobb variabilitást (variációs koefficienseket) és alacsonyabb stabilitást mutattak, mint a hot-plate eredmények, a megjelenő hatás is nagyobb volt, statisztikailag szignifikáns változásokat eredményezve 60 és 120 percnél egyaránt. A 180-240 percnél mért küszöbértékek egyértelmű visszatérési tendenciát jeleztek késői fázisú másodlagos érzékenyítődés jelei nélkül.

2.3.6 Orofaciális fájdalomérzékenység

Az ismétlődően rögzített orofaciális fájdalom osztályzatok nem mutattak változást a vivőanyagkezelt állatok fájdalommal kapcsolatos viselkedésjeleiben (14. ábra). Ellenben az NTG-kezelt egereknél a nocifenzív viselkedés jelentős növekedése mutatkozott, amely maximumát 60 percnél érte el, majd később csökkent. A hatás megfigyelt időbeli lefutása láthatóan hasonló volt ahhoz, amit a mancson mért fájdalom tesztekben láttunk. Szumatriptán adagolása 30 perccel az első NTG adás utáni vizsgálat előtt jelentősen csökkentette a fájdalmas viselkedésjeleket. A dózis-hatás összefüggés nyilvánvaló, bár lapos volt 60 perccel az NTG adás után, mivel a szumatriptán legkisebb dózisa (0,3 mg/kg) is jelentős (több mint 50%-os) gátló hatást okozott (14. ábra).



14. ábra Nitroglicerín (NTG; 10 mg/kg, i.p.), hatása az érintési ingerléssel kiváltott orofaciális fájdalomra vivőanyagos kontrollcsoporthoz (Veh+Veh) hasonlítva; és az NTG-indukált arc allodynia változásai különböző szumatriptán dózisok (0,3-3 mg/kg, s.c.; NTG+Sum) eredményeként. Az adatok bemutatása: Átlag±SEM (n=10-11/csoport). Az abszcisszán NTG injekció után eltelt idő. A csillagok statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatnak az NTG+Veh csoporthoz képest (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; két-szemponyos, ismételt mérések ANOVA, majd Bonferroni-teszt). Nyilak jelzik a gyógyszerbeadások idejét.

2.4 Következtetések összefoglalása

1. Bizonyítottuk, hogy a c-Fos expresszió a TNC-ben, valamint szomatikus- és arc-fájdalom szenzitizáció potenciálisan hasznos végpontok NTG-indukált változások kimutatására és migrén modellezésére egereken.
2. További munkára van szükség ezen egérmodellek prediktív validitásának megerősítése céljából gyógyszeres előkezelésekkel a humán és egér NTG modellekben (keresztvalidálás), és ezek eredményeinek összevetésével migrénos betegeken mutatott hatékonyságokkal.
3. Nem tudtuk megerősíteni az nNOS expresszió vizsgálatának használhatóságát egérben akár a TNC-ben, akár a TRG-ben, és NTG indukált fénykerülő magatartást sem tudtunk felmutatni.
4. Az NTG-indukált vaszkuláris változások kimutatásához vagy más módszerekre van szükség a transzkraniális lézer Doppler szkennelés helyett, vagy az egér nem megfelelő faj ezek vizsgálatára.
5. Az NTG hatások vizsgálatához ajánlatos inert vivőanyagos készítményeket és megfelelő vivőanyagos kontrollcsoportokat alkalmazni a preklinikai vizsgálatok során a hamis következtetések elkerülése céljából.

2.5 Hivatkozások

1. Ashina M (2012) Vascular changes have a primary role in migraine. *Cephalalgia* **32**, 428-430.
2. Ashina M, Hansen JM, Olesen J (2013) Pearls and pitfalls in human pharmacological models of migraine: 30 years' experience. *Cephalalgia* **33**, 540-553.
3. Bates EA, Nikai T, Brennan KC, Fu YH, Charles AC, Basbaum AI, Ptacek LJ, Ahn AH (2010) Sumatriptan alleviates nitroglycerin-induced mechanical and thermal allodynia in mice. *Cephalalgia* **30**, 170-178.
4. Di W, Zheng ZY, Xiao ZJ, Qi WW, Shi XL, Luo N, Lin JW, Ding MH, Zhang AW, Fang YN (2015) Pregabalin alleviates the nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. *Neuroscience* **284**, 11-17.
5. Iversen HK, Olesen J (1996) Headache induced by a nitric oxide donor (nitroglycerin) responds to sumatriptan. A human model for development of migraine drugs. *Cephalalgia* **16**, 412-418.
6. Krzyzanowska A, Pittolo S, Cabrerizo M, Sanchez-Lopez J, Krishnasamy S, Venero C, Avendano C (2011) Assessing nociceptive sensitivity in mouse models of inflammatory and neuropathic trigeminal pain. *J.Neurosci.Methods* **201**, 46-54.
7. Markovics A, Kormos V, Gaszner B, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Szabadfi K, Tuka B, Tajti J, Szolcsanyi J, Pinter E, Hashimoto H, Kun J, Reglodi D, Helyes Z (2012) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol.Dis.* **45**, 633-644.
8. Messlinger K, Fischer MJ, Lennerz JK (2011) Neuropeptide effects in the trigeminal system: pathophysiology and clinical relevance in migraine. *Keio J.Med* **60**, 82-89.
9. Moskowitz MA (1993) Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine. *Neurology* **43**, S16-S20.
10. Nosedá R, Burstein R (2013) Migraine pathophysiology: anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. *Pain* **154 Suppl 1**, S44-S53.
11. Olesen J (2008) The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache. *Pharmacol.Ther.* **120**, 157-171.
12. Olesen J, Jansen-Olesen I (2012) Towards a reliable animal model of migraine. *Cephalalgia* **32**, 578-580.
13. Srikiatkachorn A, Suwattanasophon C, Ruangpattanatawee U, Phansuwan-Pujito P (2002) 2002 Wolff Award. 5-HT_{2A} receptor activation and nitric oxide synthesis: a possible mechanism determining migraine attacks. *Headache* **42**, 566-574.
14. Tassorelli C, Greco R, Wang D, Sandrini G, Nappi G (2006) Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. *Eur.J.Pharmacol.* **534**, 103-107.
15. Tassorelli C, Greco R, Wang D, Sandrini M, Sandrini G, Nappi G (2003) Nitroglycerin induces hyperalgesia in rats--a time-course study. *Eur.J.Pharmacol.* **464**, 159-162.
16. Thomsen LL, Kruuse C, Iversen HK, Olesen J (1994) A nitric oxide donor (nitroglycerin) triggers genuine migraine attacks. *Eur.J.Neurol.* **1**, 73-80.
17. Tvedskov JF, Thomsen LL, Iversen HK, Gibson A, Williams P, Olesen J (2004) The prophylactic effect of valproate on glyceryltrinitrate induced migraine. *Cephalalgia* **24**, 576-585.

3 A pályázó közleményei

3.1 A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

1. Farkas S, Bolcskei K, Markovics A, Varga A, Kis-Varga A, Kormos V, Gaszner B, Horvath C, Tuka B, Tajti J, Helyes Z (2016) Utility of different outcome measures for the nitroglycerin model of migraine in mice. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* **77**, 33-44.
(IF 2.39)
2. Farkas S (2006) Silperisone: a centrally acting muscle relaxant. *CNS.Drug Rev.* **12**, 218-235.
(IF 3.47; IC 11)
3. Farkas S, Berzsenyi P, Karpati E, Kocsis P, Tarnawa I (2005) Simple pharmacological test battery to assess efficacy and side effect profile of centrally acting muscle relaxant drugs. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* **52**, 264-273.
(IF 2.32; IC 22)
4. Kocsis P, Farkas S, Fodor L, Bielik N, Than M, Kolok S, Gere A, Csejtej M, Tarnawa I (2005) Tolperisone-type drugs inhibit spinal reflexes via blockade of voltage-gated sodium and calcium channels. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **315**, 1237-1246.
(IF 4.10; IC 44)
5. Kocsis P, Tarnawa I, Kovacs G, Szombathelyi Z, Farkas S (2002) [Mydeton: a centrally acting muscle relaxant drug from Gedeon Richter LTD]. *Acta Pharm.Hung.* **72**, 49-61.
(IC 8)
6. Bielik N, Farkas S, Kocsis P (1997) Studies on the mechanism of action of RGH-5002, a centrally acting muscle relaxant, using whole cell patch clamp technique. *Neurobiology (Bp)* **5**, 43-45.
7. Farkas S, Kocsis P, Bielik N (1997) Comparative characterisation of the centrally acting muscle relaxant RGH-5002 and tolperisone and of lidocaine based on their effects on rat spinal cord in vitro. *Neurobiology (Bp)* **5**, 57-58.
(IC 16)
8. Farkas S, Karpati E (1992) The pharmacology of RGH-5002, a new centrally acting muscle relaxant with a long duration of action and less motor side-effects. *Pharmacological Res* **25 Suppl. 2**, 25-26.
(IF 0.70; IC 2)
9. Farkas S, Tarnawa I, Berzsenyi P (1989) Effects of some centrally acting muscle relaxants on spinal root potentials: a comparative study. *Neuropharmacology* **28**, 161-173.
(IF 3.91; IC 21)
10. Farkas S, Karpati E (1988) Electromyographic measurement of the flexor reflex in cats for testing centrally acting muscle relaxant drugs. *Pharmacological Res.Comm.* **20 Suppl. 1**, 141-142.
(IF 0.7; IC 2)

3.2 A pályázó további tudományos közleményei

11. Hajna Z, Szabadfi K, Balla Z, Biro Z, Degrell P, Molnar GA, Koszegi T, Tekus V, Helyes Z, Dobos A, Farkas S, Szucs G, Gabriel R, Pinter E (2016) Modeling long-term diabetes and related complications in rats. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* **78**, 1-12.
(IF 2.39)
12. Farkas B, Kardos P, Orosz S, Tarnawa I, Cseko C, Levay G, Farkas S, Lendvai B, Kovacs P (2015) Predictive validity of endpoints used in electrophysiological modelling of migraine in the trigeminovascular system. *Brain Res.* **1621**, 287-300.
(IF 2.84)
13. Nogradi K, Wagner G, Domany G, Bobok A, Magdo I, Kiss B, Kolok S, Fonagy K, Gyertyan I, Hada V, Koti J, Gal K, Farkas S, Keseru GM, Greiner I, Szombathelyi Z (2014) Thieno[2,3-b]pyridines as negative allosteric modulators of metabotropic GluR5 receptors: Hit-to-lead optimization. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **24**, 3845-3849.
(IF 2.42)

14. Orosz S, Sarusi A, Csik N, Papp JG, Varro A, Farkas S, Forster T, Farkas AS, Farkas A (2014) Assessment of efficacy of proarrhythmia biomarkers in isolated rabbit hearts with attenuated repolarization reserve. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **64**, 266-276.
(IF 2.14)
15. Szalai KK, Beke G, Eles J, Kitka T, Kovacs P, Nagy J, Farkas S, Boros A (2014) Recent Patents on Novel MCH1 Receptor Antagonists as Potential Anti-Obesity Drugs. *Recent Pat CNS.Drug Discov.* **9**, 122-140.
(IC 1)
16. Eles J, Beke G, Vago I, Bozo E, Huszar J, Tarcsay A, Kolok S, Schmidt E, Vastag M, Hornok K, Farkas S, Domany G, Keseru GM (2012) Quinolinyl- and phenantridinyl-acetamides as bradykinin B1 receptor antagonists. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **22**, 3095-3099.
(IF 2.34; IC 6)
17. Farkas S, Éles J (2011) The therapeutic potential of bradykinin B1 receptor antagonists in chronic pain. *Drugs of the Future* **36**, 301-319.
(IF 0.52)
18. Hasiwa N, Bailey J, Clausing P, Daneshian M, Eileraas M, Farkas S, Gyertyan I, Hubrecht R, Kobel W, Krummenacher G, Leist M, Lohi H, Miklosi A, Ohl F, Olejniczak K, Schmitt G, Sinnett-Smith P, Smith D, Wagner K, Yager JD, Zurlo J, Hartung T (2011) Critical evaluation of the use of dogs in biomedical research and testing in Europe. *ALTEX.* **28**, 326-340.
(IC 8)
19. Seneca N, Finnema SJ, Laszlovszky I, Kiss B, Horvath A, Pasztor G, Kapas M, Gyertyan I, Farkas S, Innis RB, Halldin C, Gulyas B (2011) Occupancy of dopamine D(2) and D(3) and serotonin 5-HT(1)A receptors by the novel antipsychotic drug candidate, cariprazine (RGH-188), in monkey brain measured using positron emission tomography. *Psychopharmacology (Berl)* **218**, 579-587.
(IF 4.08; IC 8)
20. Borza I, Bozo E, Barta-Szalai G, Kiss C, Tarkanyi G, Demeter A, Gati T, Hada V, Kolok S, Gere A, Fodor L, Nagy J, Galgoczy K, Magdo I, Agai B, Fetter J, Bertha F, Keseru GM, Horvath C, Farkas S, Greiner I, Domany G (2007) Selective NR1/2B N-methyl-D-aspartate receptor antagonists among indole-2-carboxamides and benzimidazole-2-carboxamides. *J.Med.Chem.* **50**, 901-914.
(IF 4.90; IC 32)
21. Borza I, Kolok S, Galgoczy K, Gere A, Horvath C, Farkas S, Greiner I, Domany G (2007) Kynurenic acid amides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **17**, 406-409.
(IF 2.60; IC 18)
22. Borza I, Kolok S, Gere A, Nagy J, Fodor L, Galgoczy K, Fetter J, Bertha F, Agai B, Horvath C, Farkas S, Domany G (2006) Benzimidazole-2-carboxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **16**, 4638-4640.
(IF 2.54; IC 17)
23. Borza I, Greiner I, Kolok S, Galgoczy K, Ignacz-Szendrei G, Horvath C, Farkas S, Gati T, Hada V, Domany G (2006) New benzoyl urea derivatives as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Pharmazie* **61**, 799-800.
(IF 0.61; IC 4)
24. Borza I, Kolok S, Ignacz-Szendrei G, Greiner I, Tarkanyi G, Galgoczy K, Horvath C, Farkas S, Domany G (2005) Indole-2-carboxamidines as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **15**, 5439-5441.
(IF 2.48; IC 13)
25. Barta-Szalai G, Borza I, Bozo E, Kiss C, Agai B, Proszenyak A, Keseru GM, Gere A, Kolok S, Galgoczy K, Horvath C, Farkas S, Domany G (2004) Oxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **14**, 3953-3956.
(IF 2.33; IC 36)

26. Kocsis P, Kovacs G, Farkas S, Horvath C, Szombathelyi Z, Tarnawa I (2004) NR2B receptors are involved in the mediation of spinal segmental reflex potentials but not in the cumulative motoneuronal depolarization in vitro. *Brain Res.Bull.* **64**, 133-138.
(IF 2.43; IC 3)
27. Kovacs G, Kocsis P, Tarnawa I, Horvath C, Szombathelyi Z, Farkas S (2004) NR2B containing NMDA receptor dependent windup of single spinal neurons. *Neuropharmacology* **46**, 23-30.
(IF 3.73; IC 27)
28. Nagy J, Horvath C, Farkas S, Kolok S, Szombathelyi Z (2004) NR2B subunit selective NMDA antagonists inhibit neurotoxic effect of alcohol-withdrawal in primary cultures of rat cortical neurones. *Neurochem.Int.* **44**, 17-23.
(IF 3.21; IC 52)
29. Borza I, Kolok S, Gere A, Agai-Csongor E, Agai B, Tarkanyi G, Horvath C, Barta-Szalai G, Bozo E, Kiss C, Bielik A, Nagy J, Farkas S, Domany G (2003) Indole-2-carboxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **13**, 3859-3861.
(IF 2.18; IC 16)
30. Dalmadi B, Leibinger J, Szeberenyi S, Borbas T, Farkas S, Szombathelyi Z, Tihanyi K (2003) Identification of metabolic pathways involved in the biotransformation of tolperisone by human microsomal enzymes. *Drug Metab.Dispos.* **31**, 631-636.
(IF 3.65; IC 20)
31. Kocsis P, Tarnawa I, Szombathelyi Z, Farkas S (2003) Participation of AMPA- and NMDA-type excitatory amino acid receptors in the spinal reflex transmission, in rat. *Brain Res.Bull.* **60**, 81-91.
(IF 2.61; IC 7)
32. Horvath C, Farkas S, Nagy J (1999) Receptor components of glutamate-evoked increase in intracellular Ca²⁺ concentration of neurons in culture. *Neurobiology (Bp)* **7**, 69-70.
33. Kocsis P, Farkas S, Bielik N (1997) Participation of NMDA and AMPA type glutamate receptors in spinal segmental reflex: an in vitro study. *Neurobiology (Bp)* **5**, 71-73.
34. Farkas S, Ono H (1995) Participation of NMDA and non-NMDA excitatory amino acid receptors in the mediation of spinal reflex potentials in rats: an in vivo study. *Br.J.Pharmacol.* **114**, 1193-1205.
(IF 4.74; IC 30)
35. Farkas S, Tarnawa I, Berzsényi P, Patfalusi M, Andrasi F, Ono H (1992) The role of non-NMDA excitatory amino acid receptors in the mediation of spinal reflexes. In 'Frontiers and new horizons in amino acid research'. (Ed. K Takai) pp. 471-475. (Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam)
(IC 6)
36. Tarnawa I, Farkas S, Berzsényi P, Patfalusi M, Andrasi F (1990) Reflex inhibitory action of a non-NMDA type excitatory amino acid antagonist, GYKI 52466. *Acta Physiol Hung.* **75 Suppl**, 277-278.
(IF 0.75; IC 16)
37. Tarnawa I, Farkas S, Berzsényi P, Pataki A, Andrasi F (1989) Electrophysiological studies with a 2,3-benzodiazepine muscle relaxant: GYKI 52466. *Eur.J.Pharmacol.* **167**, 193-199.
(IF 3.37; IC 128)

4 Köszönetnyilvánítás

Elsőként és elsősorban szeretném megköszönni a Richter Gedeon Rt-ben volt mentoromnak Dr. Kárpáti Egónnak a segítségét, aki pályám első 20 évében utamat egyengette és nagymértékben hozzájárult farmakológusi fejlődésemhez.

Dr. Tarnawa István, elektrofiziológus kollégám és társszerzőm számos közleményben, különleges elismerést érdemel, és én nagyon hálás vagyok mindenkori segítségéért, az együtt végzett izgalmas kutatásokért.

Szeretném kifejezni hálámat Hideki Ono professzornak, japáni mentoromnak (sensei) a tókiói egyetemen, fejlődésemre kifejtett hatásáért, általános gerincvelő elektrofiziológiai tudományos ismereteim gyarapításáért, és a patkányokon végzett *in vivo* gerincvelő elektrofiziológiai kísérletekhez nyújtott gyakorlati oktató segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani Haruhiko Shinozaki professzornak és Michiko Ishidának (Tokyo Metropolitan Institute) hasznos útmutatásaikért, amelyek az *in vitro* félbevágott patkány gerincvelő kísérletek kivitelezéséhez nyújtottak elengedhetetlen segítséget.

Hálás vagyok, Berzsényi Pálnak (Gyógyszerkutató Intézet, Budapest) a mozgásaktivitási és forgórúd kísérletek elvégzéséért. Ugyancsak szeretném elismerni Dr. Kocsis Pál jelentős hozzájárulását, akivel közösen végeztük az *in vitro* és *in vivo* gerincvelői reflex kísérleteket és írtunk ezekből tanulmányokat. Hasonlóképpen, szeretnék köszönetet mondani Bielik Norbertnek és Dr. Fodor Lászlónak patch-clamp kísérletekben való részvételükért és segítségükért.

Különösen lekötelezettje vagyok egy kivételes személynek, Fazekas Lászlónak, aki engem tanított nem csak analóg elektronikai mérnöki ismeretekre és kutatási eszközök építésére, hanem türelemre, kitartásra és önálló gondolkodásra.

Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Molnár Péternek, akinek segítése nagymértékben segítette kutatásainkat részben a Stimulat szoftver fejlesztésével, részben a patch-clamp laboratórium felállításában nyújtott konzultációs segítséggel.

Reich János volt kollégám munkája ugyancsak kiemelt elismerést érdemel számítógépes rendszereink menedzselésében, PowerPoint prezentációk összeállításában és számos kísérlet során nyújtott egyéb technikai kérdésben.

Prof. Földeák Sándor, Dr. Hegyes Peter és Dr. Petőfi Szilvia szintetikus kémikusok (Szegedi Orvostudományi Egyetem, Szerves Kémiai Tanszék), felbecsülhetetlen mértékben járultak hozzá kutatásainkhoz szilícium szubsztituált tolperizon analógok, köztük a szilperizon szintézisével.

Lekötelezettje vagyok számos technikusnak, aki különböző az izomlazítókkal kapcsolatos kísérletek során segítettek, végezték a kísérleti munkát, elsősorban: Csay Mónika, Orosz Viktória, Balla Katalin, Szentpéteri Erika, Nagy Attila, Csontos Éva, Fekete Katalin, Oravec Katalin and Laczkó Andrea.

Szeretném kifejezni köszönetemet azoknak a kollégáknak, akik a migrén NTG modellek vizsgálataiban vettek részt: Kis-Varga Ágnes, Varga Anita, Horváth Csilla (Richter Gedon Nyrt); Dr. Bölcskei Kata, Dr. Markovics Adrienn, Kormos Viktória és Dr. Gaszner Balázs (Pécsi Egyetem); Dr. Tuka Bernadett és Dr. Tajti János (Szegedi Egyetem).

Külön köszönetet szeretnék mondani Helyes Zsuzsanna professzorasszonynak és Pintér Erika professzorasszonynak a PhD folyamat során nyújtott elévülhetetlen segítségükért.

Ugyancsak nagy köszönettel tartozom Szolcsányi János professzor úrnak és Dr. Szombathelyi Zsolt kutatási igazgatónak a PhD szerzési folyamatom elindításához nyújtott inspiráló támogatásukért.

A szilperizon hatásmechanizmus vizsgálatait egy az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottságtól (OMFB) nyert kutatási támogatás is segítette.

Ugyancsak hálás vagyok a Japán Oktatási Minisztériumnak Ministry (Monbusho) azért az ösztöndíjért, mely lehetővé tette kutató munkámat, a gerincvelő elektrofiziológiai módszerek tanulmányozását Japánban.

Kísérleteink legnagyobb részéhez a laboratóriumi háttérrel és finanszírozást a Richter Gedeon gyógyszergyár adta. Ezért hálás vagyok a Társaság összes alkalmazottjának, akik munkájukkal hozzájárultak azokhoz a bevételekhez, melyek megalapozták kutatásainkhoz az anyagi fedezetet.

Végül hálámat szeretném kifejezni családomnak, feleségemnek, apósomnak és négy gyermekemnek, akik regeneráló és túlóra toleráló háttérrel biztosítottak munkámhoz.